Applied Biosystems StepOne™

Real-Time PCR System

Genotypisierungsanalysen

Applied Biosystems

Erste Schritte 1

Experimentelles Design 2

Ansetzen der Reaktionen 3

Analyse-durchführung 4

Analyse-auswertung 5

Applied Biosystems StepOne™

Real-Time PCR System

Genotypisierungsanalysen

© Copyright 2006, 2010 Applied Biosystems. All rights reserved.

Information in this document is subject to change without notice. Applied Biosystems assumes no responsibility for any errors that may appear in this document.

APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Verfahren verwenden.

NOTICE TO PURCHASER: Label License
The Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System is covered by US patents and corresponding claims in their non-US counterparts, owned by Applied Biosystems. No right is conveyed expressly, by implication, or by estoppel under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5’ nuclease methods.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

A license to perform the patented 5’ Nuclease Process for research is obtained by the purchase of (i) both Licensed Probe and Authorized 5' Nuclease Core Kit, (ii) a Licensed 5’ Nuclease Kit, or (iii) license rights from Applied Biosystems.

The TaqMan® SNP Genotyping and TaqMan® Drug Metabolizing Genotyping Assays contain Licensed Probe. Use of these products is covered by US patent claims and corresponding patent claims outside the US. The purchase of these products includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser’s own internal research. Separate purchase of an Authorized 5' Nuclease Core Kit would convey rights under the applicable claims of US patents and corresponding patent claims outside the United States, which claim 5’ nuclease methods. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

A license to perform the patented 5’ Nuclease Process for research is obtained by the purchase of (i) both Authorized 5' Nuclease Core Kit and Licensed Probe, (ii) a Licensed 5’ Nuclease Kit, or (iii) license rights from Applied Biosystems.

TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG is an Authorized 5’ Nuclease Core Kit. Use of this product is covered by US patent claims and corresponding patent claims outside the US. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser’s own internal research. Separate purchase of a Licensed Probe would convey rights under the applicable claims of US patents, and corresponding claims outside the United States. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche.

Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

TRADEMARKS:

Applera, Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, and VIC are registered trademarks, and FAM, StepOne, and TAMRA are trademarks of Applied Biosystems or its subsidiaries in the U.S. and/or certain other countries.

AmpErase, AmpliTaq Gold, and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

Excel, Microsoft and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

Bestell-Nr. 4377728 Version B
06/2010

Inhalt

Vorwort . . . . . **v**

Verwendung dieses Handbuchs v
Zugriff auf Informationen vii
Technischer Support ix
In diesem Dokument verwendete Sicherheitskonventionen x
Symbole an den Geräten xi
Sicherheitshinweise auf Geräten xii
Allgemeine Gerätesicherheit xiii
Chemische Sicherheit xiv
Sicherer Umgang mit Chemikalienabfällen xvi
Elektrische Sicherheit xviii
LED-Sicherheit xviii
Sicherer Umgang mit biologischen Gefahren xix
Sicherheit am Arbeitsplatz xix
Normen zu Sicherheit und elektromagnetischer Verträglichkeit (EMV) xx

Kapitel 1 **Erste Schritte** **1**

Informationen zum StepOne™-System 2
Informationen zu Genotypisierungsanalysen 4
Verwendung dieses Handbuchs 8
Informationen zur Beispielanalyse 9
Arbeitsablauf der Beispielanalyse 11

Kapitel 2 **Experimentelles Design** **13**

Kapitelübersicht 14
Anlegen einer neuen Analyse 15
Definieren der Analyseeigenschaften 16
Definieren der Methoden und Materialien 18
Definieren der SNP-Assays 20
Definieren der Proben und Replikate 23
Definieren des Laufprofils 25
Überprüfen des Pipettierprotokolls 27
Bestellen von Materialien für die Analyse 29
Beenden des Analysedesign-Assistenten 32

Kapitel 3 **Ansetzen der Reaktionen 35**
Kapitelübersicht 36
Ansetzen der Probenverdünnungen 37
Ansetzen des Reaktionsmix 38
Vorbereiten der Reaktionsplatte 40

Kapitel 4 **Analysedurchführung 45**
Kapitelübersicht 46
Vorbereiten des Laufs 47
Aktivieren der Benachrichtigungen (optional) 49
Starten der Analyse 51
Überwachen des Laufs 55
Entnehmen der Reaktionsplatte und Übertragen der Daten 66

Kapitel 5 **Analyseauswertung 71**
Kapitelübersicht 72
Öffnen der Analyse zur Auswertung 73
Ansicht der Amplifikationsdarstellung 74
Ansicht der Plattenbelegung 78
Ansicht der Well-Tabelle 80
Ansicht der QC-Zusammenfassung 84
Ansicht der Rohdatendarstellung 86
Ansicht der Multikomponentendarstellung 88
Ansicht der Amplifikationsdarstellung 90
Ansicht der Auswertungseinstellungen 95
Veröffentlichen der Daten 100

Anhang A **Alternative Analyseabläufe 101**
Setup für Fortgeschrittene 102
QuickStart-Arbeitsablauf 107
Verwenden von Vorlagen 112
Arbeitsablauf für den Export/Import 113

Bibliografie 117

Glossar 119

Stichwortverzeichnis 133

Vorwort

Verwendung dieses Handbuchs

Zweck dieses Handbuchs

In diesem Handbuch wird erläutert, wie auf dem Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Genotypisierungsanalysen durchgeführt werden. Dieses Handbuch erfüllt die folgenden Funktionen:

- Es ist ein Tutorial für eine Beispielanalyse anhand von Daten, die mit der Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software erstellt wurden.
- Es dient außerdem als Anleitung für Ihre eigenen Analysen.

Zielgruppe

Dieses Handbuch ist für Labormitarbeiter und -leiter bestimmt, die mit dem StepOne™-System Genotypisierungsanalysen ausführen.

Voraussetzungen

Dieses Handbuch basiert auf folgenden Voraussetzungen:

- Sie müssen sich mit dem Microsoft Windows® XP-Betriebssystem auskennen.
- Sie müssen mit Internet und Internetbrowsern umgehen können.
- Sie müssen sich mit DNA-Proben und ihrer Vorbereitung für den PCR-Prozess auskennen.
- Sie müssen sich mit Datenspeicherung, Datenübertragung, Kopieren und Einfügen auskennen.
- Wenn Sie vorhaben, das StepOne™-System in den vorhandenen Datenfluss des Labors zu integrieren, müssen Sie über Netzwerkerfahrung verfügen.

Textkonventionen

Dieses Handbuch verwendet die folgenden Konventionen:

- **Fett gedruckter** Text weist auf Benutzeraktionen hin. Zum Beispiel:

  Geben Sie **0** ein, und drücken Sie dann bei allen übrigen Feldern auf **Enter**.
- *Kursiv gedruckter* Text weist auf neue und wichtige Wörter hin und wird außerdem zur Hervorhebung verwendet. Zum Beispiel:

  Erstellen Sie vor einer Analyse *immer* eine neue Matrix.
- Ein rechtes Pfeilsymbol (▸) trennt aufeinander folgende Befehle aus einem Dropdown- oder Shortcut-Menü voneinander ab. Zum Beispiel:

  Wählen Sie **Datei ▸ Öffnen**.

Beachtungshinweise

In den Applied Biosystems-Anwenderunterlagen werden zwei Beachtungshinweise verwendet. Jeder Begriff schreibt einen bestimmten Beachtungs- oder Handlungsgrad vor, wie nachstehend erläutert:

Hinweis: Weist auf interessante oder hilfreiche Informationen hin, die für die Verwendung des Produkts jedoch nicht entscheidend sind.

WICHTIG! Weist auf Informationen hin, die für die sachgemäße Verwendung des Geräts, des Chemikalienkits oder die sichere Verwendung einer Chemikalie nötig sind.

Im Folgenden sind Beispiele für Beachtungshinweise aufgeführt:

Hinweis: Sie können auch über die Steuerkonsole auf die Kalibrierungsfunktion zugreifen.

WICHTIG! Für die Verifizierung Ihrer Client-Verbindung benötigen Sie einen gültigen Nutzernamen.

Sicherheitswarnbegriffe

In den Anwenderunterlagen werden auch Sicherheitswarnbegriffe verwendet. Weitere Informationen finden Sie unter „Sicherheitswarnbegriffe“ auf Seite x.

Zugriff auf Informationen

Dazugehörige Dokumentation

Im Lieferumfang des StepOne™-Systems ist die folgende Dokumentation enthalten:

Dokument	Englische BN	Deutsche BN
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Genotyping Experiments	4376786	4377729
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments	4376787	—
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments	4376785	4377742
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Standard Curve Experiments	4376784	4377736
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation, Networking, and Maintenance Guide	4376782	4377798
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Quick Reference Card	4376783	4377792
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Site Preparation Guide	4376768	4378359
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software Help	—	—

Die folgende Dokumentation kann von Applied Biosystems käuflich erworben werden:

Dokument	BN
Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol	4375575
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Performance Verification Protocol	4376791
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Qualification-Operation Qualification Protocol	4376790
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Planned Maintenance Protocol	4376788
Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol	4334431
Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol	4367671
TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol	4332856
TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol	4362038
Ordering TaqMan® SNP Genotyping Assays Quick Reference Card	4374204
Performing a Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card	4371394
Performing a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card	4367636

Dokument	BN
Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol	4312214
Allelic Discrimination Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Quick Reference Card	4312212

Hinweis: Weitere Informationen über Dokumentationen finden Sie unter „Technischer Support“ auf Seite ix.

Auf Informationen der Software-Hilfe zugreifen

In der Hilfefunktion der StepOne™-Software finden Sie eine Beschreibung aller Funktionen der Benutzeroberfläche. Sie haben folgende Möglichkeiten, um auf die Hilfefunktion der StepOne™-Software zuzugreifen:

- Drücken Sie auf **F1**.
- Klicken Sie auf in der Symbolleiste.
- Wählen Sie **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe).

So können Sie in der Hilfefunktion nach Themen suchen:

- Sehen Sie im Inhaltsverzeichnis nach.
- Suchen Sie nach einem bestimmten Thema.
- Suchen Sie im alphabetischen Index.

Kunden-Feedback

Applied Biosystems ist für Kommentare und Vorschläge zur Verbesserung der Anwenderunterlagen dankbar. Sie können Ihre Kommentare an die folgende E-Mail-Adresse schicken:

techpubs@appliedbiosystems.com

WICHTIG! Bitte schicken Sie an die oben angegebene E-Mail-Adresse nur Kommentare und Vorschläge zu unseren Dokumentationen. Wenn Sie Unterlagen bestellen oder PDF-Dateien herunterladen möchten, oder wenn Sie eine technische Frage haben, gehen Sie auf **www.appliedbiosystems.com**, und klicken Sie dort auf den **Support**-Link. (Siehe „Technischer Support“ unten).

Technischer Support

Die aktuellen Service- und Support-Informationen für alle Standorte erhalten Sie durch Klicken auf den **Support**-Link unter **www.appliedbiosystems.com**.

Auf der Support-Seite haben Sie die folgenden Möglichkeiten:

- In den häufig gestellten Fragen (FAQs) suchen
- Eine Frage direkt an den technischen Support richten
- Applied Biosystems-Anwenderunterlagen, Sicherheitsdatenblätter, Analysezertifikate oder sonstige Dokumente bestellen
- PDF-Dokumente herunterladen
- Informationen über Kundenschulungen abrufen
- Softwareaktualisierungen und -Patches herunterladen

Darüber hinaus finden Sie auf der Support-Seite die weltweiten Telefon- und Faxnummern der Kundenservice- und Verkaufsstellen von Applied Biosystems.

WICHTIG! Wenn Sie von diesem Handbuch dazu angewiesen werden, oder wenn Sie einen Wartungstermin für Ihr StepOneStepOne™-Gerät vereinbaren möchten (z. B. anberaumte Jahreswartung oder Temperaturprüfung/-kalibrierung), kontaktieren Sie das Kundenservicezentrum von Applied Biosystems. Unter **http://www.appliedbiosystems.com/support/contact** finden Sie die entsprechenden Telefonnummern oder können eine E-Mail an das Kundenservicezentrum schicken.

In diesem Dokument verwendete Sicherheitskonventionen

Sicherheits-warnbegriffe

In den Applied Biosystems-Anwenderunterlagen wird unter Verwendung von vier Sicherheitswarnbegriffen auf mögliche Gefahren hingewiesen. Jeder Warnbegriff - **WICHTIG, VORSICHT, WARNUNG, GEFAHR** - schreibt einen bestimmten Beachtungs- oder Handlungsgrad vor, wie nachstehend erläutert.

Definitionen

WICHTIG! – Weist auf Informationen hin, die für die sachgemäße Verwendung des Geräts, des Chemikalienkits oder die sichere Verwendung einer Chemikalie nötig sind.

– Weist auf eine potenzielle Gefahrensituation hin, deren Missachtung zu kleineren oder moderaten Verletzungen führen könnte. Dieser Begriff kann auch dazu verwendet werden, um auf sicherheitsgefährdende Handlungen hinzuweisen.

– Weist auf eine potenzielle Gefahrensituation hin, deren Missachtung zu Lebensgefahr oder schweren Verletzungen führen könnte.

– Weist auf eine unmittelbare Gefährdung hin, die bei Missachtung lebensgefährlich ist oder zu schweren Verletzungen führt. Dieses Signalwort wird nur für absolute Extremsituationen verwendet.

Mit Ausnahme der WICHTIG-Hinweise werden die Sicherheitswarnbegriffe in den Applied Biosystems-Dokumenten zusammen mit einem Dreieck angezeigt, das ein Gefahrensymbol enthält. Diese Gefahrensymbole sind mit den Gefahrensymbolen identisch, die an den Applied Biosystems-Geräten angebracht sind (siehe „Sicherheitssymbole“ auf Seite xi).

Beispiele

WICHTIG! Sie müssen für jede 96-Well-Platte eine eigene Tabellenkalkulation erstellen.

CHEMISCHE GEFAHREN TaqMan® Universal PCR Master Mix kann Augen- und Hautreizungen hervorrufen. Durch Schlucken oder Einatmen können Beschwerden verursacht werden. Lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt, und befolgen Sie die Handhabungsanweisungen. Tragen Sie eine geeignete Schutzbrille sowie Schutzkleidung und -handschuhe.

VERLETZUNGSGEFAHR Beim Betrieb des Geräts können Heizdeckel und Heizblock Temperaturen von über 100 °C erreichen.

GEFAHR **ELEKTRISCHE SPANNUNG** Für einen sicheren Gerätebetrieb ist die Aufrechterhaltung der Erdung unerlässlich. Betreiben Sie das System nie ohne angeschlossenen Erdleiter.

Symbole an den Geräten

Elektrische an den Geräten

Auf den Applied Biosystems-Geräten können Sie die folgenden elektrischen Symbole finden.

Symbol	Beschreibung
	Weist auf die **Ein**-Position des Hauptnetzschalters hin.
	Weist auf die **Aus**-Position des Hauptnetzschalters hin.
	Weist auf einen Standby-Schalter hin, mit dem das Gerät auf **Standby**-Betrieb umgeschaltet werden kann. Wenn der Schalter auf Standby gestellt ist, können gefährliche elektrische Spannungen auftreten.
	Weist auf die **Ein/Aus**-Position eines Hauptnetzdruckschalters hin.

Symbol	Beschreibung
	Dieses Symbol zeigt einen möglichen Anschluss an die Betriebserde eines anderen Geräts an. Dies ist keine geschützte Erdklemme.
	Dieses Symbol zeigt eine geschützte Erdklemme an, die geerdet werden muss, bevor andere elektrische Anschlüsse zum Gerät hergestellt werden.
	Ein mit diesem Symbol gekennzeichneter Anschluss kann Wechselstrom oder -spannung erhalten oder abgeben.
	Ein mit diesem Symbol gekennzeichneter Anschluss kann Wechselstrom oder -spannung und Gleichstrom oder -spannung erhalten oder abgeben.

Sicherheitssymbole

Die Applied Biosystems-Geräte können mit den folgenden *S*icherheitssymbolen versehen sein. Die Symbole werden entweder allein angezeigt oder mit einem Text, der die jeweilige Gefahr beschreibt (siehe „Sicherheitshinweise auf Geräten“ auf Seite xii). Diese Sicherheitssymbole können auch in Kombination mit den Hinweisen GEFAHR, WARNUNG und VORSICHT erscheinen, die in diesem und anderen Dokument(en) verwendet werden.

Symbol	Beschreibung
	Dieses Symbol fordert zwecks näherer Informationen zum Konsultieren des Handbuchs auf und warnt den Anwender, vorsichtig vorzugehen.
	Weist auf heiße Oberflächen oder andere Gefahren im Zusammenhang mit hohen Temperaturen hin und warnt den Anwender, vorsichtig vorzugehen.

Symbol	Beschreibung
	Weist auf das Vorhandensein beweglicher Teile hin und warnt den Anwender, vorsichtig vorzugehen.
	Weist auf Stromschlaggefahr hin und warnt den Anwender, vorsichtig vorzugehen.
	Dieses Symbol weist auf einen Laser im Geräteinnern hin und warnt den Anwender, vorsichtig vorzugehen.

Umweltsymbole an den Geräten

Das folgende Symbol gilt für alle elektrischen und elektronischen Produkte von Applied Biosystems, die nach dem 13. August 2005 auf den Markt gebracht wurden.

Symbol	Beschreibung
	Dieses Produkt darf nicht im unsortierten Hausmüll entsorgt werden. Halten Sie die lokalen Richtlinien der städtischen Abfallverordnung für eine ordnungsgemäße Entsorgung ein, um Umweltschäden durch Elektro- und Elektronikgeräte zu minimieren (WEEE). **Kunden aus der Europäischen Union:** Wenden Sie sich für Abholung und Recycling von Geräten an Ihren lokalen Applied Biosystems Kundenservice. Unter **www.appliedbiosystems.com** finden Sie eine Liste der Kundenservice-Niederlassungen in der Europäischen Union.

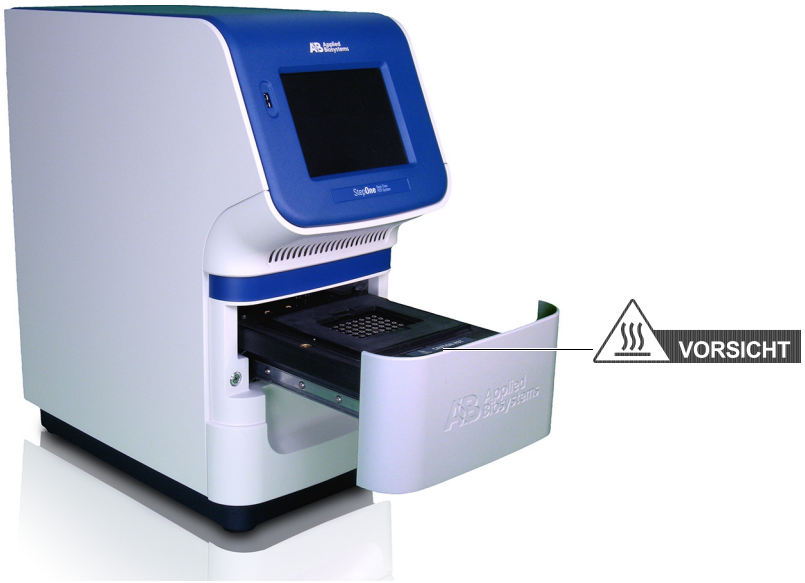
Sicherheitshinweise auf Geräten

Die Hinweise VORSICHT, WARNUNG und GEFAHR können in Kombination mit den im vorigen Abschnitt beschriebenen Sicherheitssymbolen an den Applied Biosystems-Geräten angebracht sein.

Englisch	Französisch
CAUTION Hazardous chemicals. Read the Material Safety Data Sheets (MSDSs) before handling.	**ATTENTION** Produits chimiques dangeureux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels avant la manipulation des produits.
CAUTION Hazardous waste. Refer to MSDS(s) and local regulations for handling and disposal.	**ATTENTION** Déchets dangereux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels et la régulation locale associées à la manipulation et l'élimination des déchets.
CAUTION Hot surface.	**ATTENTION** Surface brûlante.
DANGER High voltage.	**DANGER** Haute tension.
WARNING To reduce the chance of electrical shock, do not remove covers that require tool access. No user-serviceable parts are inside. Refer servicing to Applied Biosystems qualified service personnel.	**AVERTISSEMENT** Pour éviter les risques d'électrocution, ne pas retirer les capots dont l'ouverture nécessite l'utilisation d'outils. L'instrument ne contient aucune pièce réparable par l'utilisateur. Toute intervention doit être effectuée par le personnel de service qualifié de Applied Biosystems.
CAUTION Moving parts.	**ATTENTION** Parties mobiles.
DANGER Class 3B (III) visible and/or invisible LED radiation present when open and interlocks defeated. Avoid exposure to beam.	**DANGER** Rayonnement visible ou invisible d'un faisceau LED de Classe 3B, (III) en cas d'ouverture et de neutralisation des dispositifs de sécurité. Evitez toute exposition au faisceau.

Anbringung der Warnhinweise

Am StepOne™-System befindet sich an der unten angezeigten Stelle ein Warnhinweis:



Allgemeine Gerätesicherheit

WARNUNG **VERLETZUNGSGEFAHR** Die nicht sachgemäße Verwendung des Geräts entsprechend den Vorgaben von Applied Biosystems kann zu Verletzungen oder Schäden an dem Gerät führen.

Gerät bewegen und anheben

VORSICHT **VERLETZUNGSGEFAHR** Das Gerät darf nur von dem im geltenden Handbuch zur Standortvorbereitung genannten Personal oder Händler bewegt und aufgestellt werden. Wenn Sie das Gerät nach seiner Installation an einen anderen Standort verlegen wollen, versuchen Sie nicht, das Gerät ohne Hilfe oder geeignete Hilfsmittel anzuheben oder zu bewegen, und wenden Sie immer geeignete Hebetechniken an. Unsachgemäßes Anheben kann zu schmerzhaften und bleibenden Rückenverletzungen führen. Je nach Gewicht kann das Anheben und Bewegen eines Geräts mindestens zwei Personen erfordern.

Computer und Monitore bewegen und anheben

WARNUNG Versuchen Sie nicht, den Computer oder Monitor allein zu heben oder zu bewegen. Je nach Gewicht des Computers oder Monitors sind dafür mindestens zwei Personen erforderlich.

Bitte beachten Sie beim Anheben des Computers oder Monitors Folgendes:

- Stellen Sie sicher, dass Sie den Computer oder Monitor beim Anheben fest im Griff haben.
- Vergewissern Sie sich, dass der Weg vom Ausgangsort bis zum Bestimmungsort frei von Hindernissen ist.
- Drehen Sie beim Anheben eines Objekts nicht Ihren Oberkörper.
- Halten Sie Ihr Rückgrat gerade, und führen Sie die Hebebewegung aus den Beinen heraus aus.

- Koordinieren Sie Hub- und andere Bewegungen vor ihrer Ausführung mit allen Beteiligten.
- Heben Sie das Objekt nicht aus dem Verpackungskarton heraus, sondern kippen Sie den Karton zur Seite, und halten Sie ihn fest, während eine andere Person den Computer oder Monitor aus der Kiste zieht.

Gerät bedienen

Stellen Sie sicher, dass das gesamte Bedienpersonal des Geräts folgende Voraussetzungen erfüllt:

- Es muss in den allgemeinen Sicherheitsvorkehrungen für Labors und den speziellen Sicherheitsvorkehrungen für das Gerät unterwiesen worden sein.
- Es muss alle geltenden Sicherheitsdatenblätter (MSDSs) gelesen und verstanden haben. Siehe „Informationen über Sicherheitsdatenblätter (MSDSs)“ auf Seite xv.

Gerät reinigen oder dekontaminieren

VORSICHT Halten Sie vor Verwendung einer anderen Reinigungs- oder Dekontaminierungsmethode als der vom Hersteller empfohlenen Methode mit diesem Rücksprache, um sicherzustellen, dass das Gerät durch diese Alternativmethode nicht beschädigt wird.

Chemische Sicherheit

Warnung bezüglich chemischer Gefahren

WARNUNG **CHEMISCHE GEFAHREN** Lesen Sie vor Handhabung der Chemikalien die vom Hersteller bereitgestellten Sicherheitsdatenblätter (MSDS), und halten Sie alle relevanten Sicherheitsvorkehrungen ein.

WARNUNG **CHEMISCHE GEFAHREN BEI LAGERUNG** Abfallprodukte niemals in Glasbehältern sammeln oder aufbewahren, da diese zerbrechen oder zersplittern können. Reagenzien- und Abfallflaschen können Sprünge bekommen und lecken. Alle Abfallflaschen sollten in einem Sicherheitsbehälter aus Polyethylen niedriger Dichte mit befestigtem Deckel und in senkrechter Stellung arretierten Griffen geschützt werden. Bei der Handhabung von Reagenzien- und Abfallflaschen geeignete(n) Augenschutz, Bekleidung und Handschuhe tragen.

Chemische Sicherheits-richtlinien

So minimieren Sie die Gefährdung durch Chemikalien:

- Vor Lagerung, Handhabung oder Arbeiten mit Chemikalien oder Gefahrstoffen sind die vom Chemikalienhersteller bereitgestellten Sicherheitsdatenblätter (MSDSs) einzusehen und zu verinnerlichen (siehe „Informationen über Sicherheitsdatenblätter (MSDSs)“ auf Seite xv.)
- Der Kontakt mit Chemikalien ist möglichst gering zu halten. Bei der Handhabung von Chemikalien entsprechende Personenschutzausrüstung tragen, wie z. B. Schutzbrille, Handschuhe oder Schutzbekleidung. Weitere Sicherheitsrichtlinien enthält das entsprechende Sicherheitsdatenblatt.

- Atmen Sie möglichst keine Chemikalien ein. Lassen Sie Chemikalienbehälter nicht offen stehen, und verwenden Sie diese nur mit ausreichender Lüftung (zum Beispiel Abzugshauben). Weitere Sicherheitsrichtlinien enthält das entsprechende Sicherheitsdatenblatt.
- Prüfen Sie in regelmäßigen Abständen auf Chemikalienlecks oder -verschüttungen. Bei Lecks oder Verschüttungen die vom Hersteller im entsprechenden Sicherheitsdatenblatt empfohlenen Reinigungsmaßnahmen durchführen.
- Bezüglich der Lagerung, Handhabung und Entsorgung von Chemikalien sind sämtliche lokalen, landesweiten/regionalen bzw. nationalen Gesetze und Auflagen einzuhalten.

Informationen über Sicherheitsdatenblätter (MSDSs)

Die Chemikalienhersteller liefern *neuen* Kunden zusammen mit den gefährlichen Chemikalien ein aktuelles Sicherheitsdatenblatt (MSDS). Außerdem legen sie nach Aktualisierung eines Sicherheitsdatenblatts dem Kunden bei der nächsten Lieferung der gefährlichen Chemikalie das aktualisierte Sicherheitsdatenblatt bei. Sicherheitsdatenblätter enthalten die erforderlichen Sicherheitsangaben für die sichere Lagerung, Handhabung, Beförderung und Entsorgung der betreffenden Chemikalie.

Jedes Mal, wenn Sie ein neues Sicherheitsdatenblatt mit einer gefährlichen Chemikalie erhalten, müssen Sie das alte Sicherheitsdatenblatt damit ersetzen.

Sicherheitsdatenblätter (MSDSs) erhalten

Die Sicherheitsdatenblätter für alle von Applied Biosystems gelieferten Chemikalien stehen Ihnen 24 Stunden am Tag zur Verfügung. So können Sie Sicherheitsdatenblätter beziehen:

1. Gehen Sie auf **https://docs.appliedbiosystems.com/msdssearch.html**
2. Machen Sie im Feld Search (Suche) auf der Seite MSDS Search (Sicherheitsdatenblattsuche) die folgenden Angaben:
   a. Geben Sie den Namen der Chemikalie, die Bestellnummer oder sonstige Informationen ein, die Sie in dem jeweiligen Sicherheitsdatenblatt vermutlich erwarten.
   b. Wählen Sie die gewünschte Sprache.
   c. Klicken Sie auf **Search** (Suche).
3. So können Sie die gewünschten Dokumente ansehen, herunterladen oder ausdrucken:
   a. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Dokumententitel.
   b. Wählen Sie:
      - **Öffnen**, um das Dokument anzuzeigen
      - **Ziel speichern unter**, um eine PDF-Version des Dokuments unter dem von Ihnen gewählten Zielpfad zu speichern
      - **Ziel drucken**, um das Dokument zu drucken

4. So können Sie sich auf der Seite Search Results (Suchergebnisse) die Kopie eines Sicherheitsdatenblattes per Fax oder E-Mail schicken lassen:
   a. Wählen Sie unter dem Dokumententitel zwischen den Optionen **Fax** oder **Email** (E-Mail).
   b. Klicken Sie auf **RETRIEVE DOCUMENTS** (Dokumente abrufen) am unteren Ende der Dokumentenliste.
   c. Geben Sie die erforderlichen Informationen ein.
   d. Klicken Sie auf **View/Deliver Selected Documents Now** (Ausgewählte Dokumente jetzt ansehen/verschicken).

Hinweis: Kontaktieren Sie wegen Sicherheitsdatenblättern für Chemikalien, die nicht von Applied Biosystems geliefert werden, den jeweiligen Chemikalienhersteller.

Sicherer Umgang mit Chemikalienabfällen

Gefährliche Chemikalienabfälle

VORSICHT **GEFÄHRLICHE ABFALLPRODUKTE** Weitere Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern und den lokalen Vorschriften zu Handhabung und Entsorgung.

WARNUNG **GEFÄHRLICHE CHEMIKALIENABFÄLLE** Die Abfallprodukte von Applied Biosystems-Geräten sind potenzielle Gefahrstoffe und können zu Verletzungen, Erkrankungen und zum Tod führen.

WARNUNG **CHEMISCHE GEFAHREN BEI LAGERUNG** Abfallprodukte niemals in Glasbehältern sammeln oder aufbewahren, da diese zerbrechen oder zersplittern können. Reagenzien- und Abfallflaschen können Sprünge bekommen und lecken. Alle Abfallflaschen sollten in einem Sicherheitsbehälter aus Polyethylen niedriger Dichte mit befestigtem Deckel und in senkrechter Stellung arretierten Griffen geschützt werden. Bei der Handhabung von Reagenzien- und Abfallflaschen geeignete(n) Augenschutz, Bekleidung und Handschuhe tragen.

Sicherheitshinweise für Chemikalienabfälle

So minimieren Sie die Gefährdung durch Chemikalienabfälle:

- Vor der Lagerung, Handhabung oder Entsorgung von Chemikalienabfällen sind die vom Chemikalienhersteller bereitgestellten Sicherheitsdatenblätter einzusehen und zu verinnerlichen.
- Stellen Sie primäre und sekundäre Abfallbehälter bereit. (Der primäre Abfallbehälter ist für die unmittelbar anfallenden Abfälle bestimmt. Der sekundäre Behälter fängt die aus dem primären Behälter leckenden oder verschütteten Chemikalienabfälle auf. Beide Behälter müssen mit dem Abfallmaterial kompatibel sein und die landesweiten, nationalen und lokalen Richtlinien für die Lagerung von Behältern einhalten.)
- Der Kontakt mit Chemikalien ist möglichst gering zu halten. Bei der Handhabung von Chemikalien entsprechende Personenschutzausrüstung tragen, wie z. B. Schutzbrille, Handschuhe oder Schutzbekleidung. Weitere Sicherheitsrichtlinien enthält das entsprechende Sicherheitsdatenblatt.
- Atmen Sie möglichst keine Chemikalien ein. Lassen Sie Chemikalienbehälter nicht offen stehen, und verwenden Sie diese nur mit ausreichender Lüftung (zum Beispiel Abzugshauben). Weitere Sicherheitsrichtlinien enthält das entsprechende Sicherheitsdatenblatt.
- Chemikalienabfälle unter einer Abzugshaube handhaben.
- Verschließen Sie einen Abfallbehälter nach seiner Leerung mit der dazugehörigen Abdeckung.
- Der Inhalt von Abfallschalen und -flaschen ist gemäß den Regeln der Guten Laborpraxis sowie der lokalen, landesweiten/regionalen bzw. nationalen Umweltschutz- bzw. Gesundheitsschutzauflagen zu entsorgen.

Abfallentsorgung

Wenn beim Betrieb des Geräts potenziell gefährliche Abfallprodukte erzeugt werden, müssen Sie folgende Vorkehrungen einhalten:

- Charakterisieren Sie den von den jeweiligen Anwendungen, Reagenzien und Substraten Ihres Labors erzeugten Abfall (gegebenenfalls anhand einer Analyse).
- Sorgen Sie für die Gesundheit und Sicherheit aller Labormitarbeiter.
- Vergewissern Sie sich, dass bei Lagerung, Überführung, Transport und Entsorgung von Geräteabfällen alle lokalen, landesweiten/regionalen bzw. nationalen Auflagen eingehalten werden.

WICHTIG! Radioaktive bzw. biogefährliche Stoffe erfordern u. U. spezielle Handhabungsmaßnahmen, und es gelten evtl. Entsorgungseinschränkungen.

Elektrische Sicherheit

STROMSCHLAGGEFAHR Wenn beim Betrieb des StepOne™-Systems die Verkleidung nicht ordnungsgemäß angebracht ist, besteht die Gefahr eines Stromschlags. Entfernen Sie die Geräteverkleidung nicht. Beim Entfernen der Geräteverkleidung werden Hochspannungskontakte freigelegt.

Sicherungen

BRANDGEFAHR Unsachgemäß installierte Sicherungen oder Hochspannungsversorgungen können das Kabelsystem des Geräts beschädigen und einen Brand verursachen. Vergewissern Sie sich vor Einschalten des Geräts, dass die Sicherungen ordnungsgemäß installiert sind und die Gerätespannung auf das Stromnetz in Ihrem Labor ausgelegt ist.

BRANDGEFAHR Zur Aufrechterhaltung des Brandschutzes nur aufgeführte und zertifizierte Ersatzsicherungen des angegebenen Typs und Nennwerts verwenden.

Strom

ELEKTRISCHE SPANNUNG Die Aufrechterhaltung der Erdung ist für den sicheren Gerätebetrieb unerlässlich. Das Gerät darf niemals bei unterbrochener Erdung betrieben werden.

ELEKTRISCHE SPANNUNG Verwenden Sie für die Spannungsversorgung in Ihrem Labor nur entsprechend konfigurierte und genehmigte Kabel.

ELEKTRISCHE SPANNUNG Schließen Sie das System an eine ordnungsgemäß geerdete Steckdose mit passender Stromstärke an.

Überspannungs-nennwert

Die Installationskategorie (Überspannungskategorie) für das StepOne™-System ist II; es ist als tragbares Gerät klassifiziert.

LED-Sicherheit

So sorgen Sie für einen sicheren LED-Betrieb:

- Das System ist von einem technischen Vertreter von Applied Biosystems zu warten.
- Alle Schaltbretter müssen beim Betrieb des Geräts angebracht sein. Bei korrekter Installation sollte keine Strahlung nachweisbar sein. Wenn ein Schaltbrett beim Betrieb des LEDs entfernt wird (bei Servicearbeiten mit deaktivierten Sicherheitsverriegelungen), kann die LED-Strahlung die für die Klasse **3B** zulässigen Werte übersteigen.
- Entfernen Sie keine Sicherheitshinweise, und deaktivieren Sie nicht die Sicherheitsverriegelungen.

Sicherer Umgang mit biologischen Gefahren

Allgemeine biologische Gefahren

BIOGEFÄHRDUNG Biologische Proben wie z. B. Gewebe, Körperflüssigkeiten, infektiöse Substanzen sowie Menschen- und Tierblut können ansteckende Krankheiten übertragen. Beachten Sie alle geltenden lokalen, landesweiten/regionalen bzw. nationalen Vorschriften. Tragen Sie geeignete Schutzausrüstung, die sich unter anderem aus Folgendem zusammensetzt: Schutzbrille, Gesichtsschutz, Schutzbekleidung/Laborkittel und Handschuhe. Alle Arbeiten sind in ordnungsgemäß ausgestatteten Einrichtungen unter Verwendung geeigneter Sicherheitsausrüstung auszuführen (zum Beispiel Abfangvorrichtungen). Die Mitarbeiter sind vor der Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien gemäß der geltenden Gesetze und der Anforderungen des Unternehmens/des Instituts zu schulen. Lesen und befolgen Sie die im Folgenden aufgeführten geltenden Gesetze und Richtlinien:

- Die vom US-Gesundheitsministerium (U.S. Department of Health and Human Services) in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (Biologische Sicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboratorien) veröffentlichten Richtlinien (Stock Nr. 017-040-00547-4; **bmbl.od.nih.gov**)
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (OSHA-Standards für blutgebundene Pathogene) (29 CFR§1910.1030; **www.access.gpo.gov/ nara/cfr/waisidx_01/ 29cfr1910a_01.html**).
- Die Protokolle des Biosicherheitsprogramms Ihres Unternehmens/Instituts über die Arbeit/den Umgang mit potenziell infektiösen Materialien.

Weitere Informationen über die Vorschriften für Biogefährdung finden Sie auf der folgenden Website:

http://www.cdc.gov

Sicherheit am Arbeitsplatz

Eine ergonomisch korrekte Einrichtung Ihres Arbeitsplatzes kann Beschwerden wie z. B. Müdigkeit, Schmerzen und Verspannungen verringern oder verhindern. Sie können diese Beschwerden minimieren oder verhindern, indem Sie Ihren Arbeitsplatz so einrichten, dass eine neutrale oder entspannte Arbeitshaltung gefördert wird.

MUSKULOSKELETTAL- UND REPETITIVE BEWEGUNGEN

WARNHINWEIS Diese Gefahren sind auf potenzielle Risikofaktoren zurückzuführen, wie unter anderem sich wiederholende Bewegungsabläufe, ungünstige Körperhaltung, Überanstrengung, Verharren in statischen Sitzpositionen, Anpressdruck und andere Umweltfaktoren des Arbeitsplatzes.

So können Sie das Risiko muskuloskelettaler Erkrankungen und repetitiver Bewegungen minimieren:

- Verwenden Sie nur Geräte, die eine neutrale und bequeme Arbeitsposition unterstützen und Ihnen einen einfachen Zugriff auf Tastatur, Monitor und Maus ermöglichen.
- Platzieren Sie Tastatur, Maus und Monitor so, dass Sie eine entspannte Körper- und Kopfhaltung einnehmen können.

Normen zu Sicherheit und elektromagnetischer Verträglichkeit (EMV)

US-amerikanische und kanadische Sicherheitsnormen

Das StepOne™-System wurde auf die Einhaltung der folgenden Normen getestet:

UL 61010A-1/CAN/CSA C22.2 No. 1010.1-92: „Safety Requirements for Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use, Part 1: Allgemeine Anforderungen."

UL 61010A-2-010/CAN/CSA 1010.2.010: „Particular Requirements for Laboratory Equipment for the Heating of Materials" (Besondere Anforderungen an Laborgeräte für das Erhitzen von Stoffen)

Aktuelle FDA-Norm „Radiation Control for Health and Safety Act of 1968 Performance Standard 21 CFR 1040.10 and 1040.11" (Gesetz zur Strahlungskontrolle für Sicherheit und Gesundheit von 1968)

Kanadische EMV-Norm

Das Gerät wurde auf Einhaltung der Norm ICES-001, Ausgabe 3, getestet: „Industrial, Scientific, and Medical Radio Frequency Generators" (Radiofrequenzgeneratoren für Industrie, Wissenschaft und Medizin)

Europäische Sicherheits- und EMV-Normen

Sicherheit

Dieses Gerät hält die europäischen Sicherheitsbestimmungen ein (Niederspannungsrichtlinie 73/23/EEC). Dieses Gerät wurde auf die Einhaltung der folgenden beiden Normen getestet: EN 61010-1:2001 „Sicherheitsbestimmungen für elektrische Mess-, Steuer-, Regel- und Laborgeräte - Teil 1: Allgemeine Anforderungen."

EN 61010-2-010: „Besondere Anforderungen an Laborgeräte für das Erhitzen von Stoffen"

EN 61010-2-081: „Besondere Anforderungen an automatische und semiautomatische Laborgeräte für Analysen und andere Zwecke"

EMV

Dieses Gerät hält die europäischen Sicherheitsbestimmungen für Störemissionen und Funkentstörung ein (EMC-Richtlinie 89/336/EEC). Dieses Gerät wurde auf die Einhaltung der Norm EN 61326 (Gruppe 1, Klasse B) getestet: „Elektrische Betriebsmittel für Leittechnik und Laboreinsatz – EMV-Anforderungen"

Australische EMV-Normen

Dieses Gerät wurde auf die Einhaltung der Norm AS/NZS 2064 getestet: „Limits and Methods Measurement of Electromagnetic Disturbance Characteristics of Industrial, Scientific, and Medical (ISM) Radio-frequency Equipment" (Grenzwerte und Messverfahren für elektromagnetische Störeigenschaften von industriellen, wissenschaftlichen und medizinischen Hochfrequenzgeräten (ISM))

1 Erste Schritte

Dieses Kapitel umfasst die folgenden Themen:

- Informationen zum StepOne™-System 2
- Informationen zu Genotypisierungsanalysen 4
- Verwendung dieses Handbuchs. 8
- Informationen zurBeispielanalyse 9
- Arbeitsablauf der Beispielanalyse. 11

Hinweis: Weitere Informationen zu einem Thema dieses Handbuchs finden Sie in der Hilfe der Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software, indem Sie entweder **F1** drücken, in der Symbolleiste auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Informationen zum StepOne™-System

Informationen zum System

Mithilfe fluoreszenzbasierter PCR-Reagenzien ermöglicht das Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (StepOne™-System) die:

- Quantitative Detektion von Nukleinsäuresequenzen mit Echtzeit-PCR-Analyse
- Quantitative Detektion von Nukleinsäuresequenzen mit Endpunkt- und Schmelzkurvenanalyse

Informationen zur Datenerfassung

Das StepOne™-System erfasst in Abhängigkeit von dem gewählten Laufprofil während einer PCR an verschiedenen Punkten Fluoreszenzrohdaten:

Laufprofil		Datenerfassungspunkt
Echtzeit-Läufe	Standardkurve	Das System erfasst Daten nach jedem Extensionsschritt der PCR.
	Relative Standardkurve	
	Vergleichende C_T ($\Delta\Delta C_T$)	
Endpunkt-Läufe	Genotypisierung	Das System erfasst Daten vor und nach der PCR. Bei Genotypisierungsanalysen kann die StepOne™-Software Daten auch während des Laufs anzeigen (Echtzeit), was bei der Problembehebung eine große Hilfe sein kann.
	Positiv/Negativ	Das System erfasst Daten vor und nach der PCR.

Unabhängig vom Laufprofil besteht ein Datenerfassungspunkt bzw. eine *Messung* aus drei Phasen:

1. **Anregung**: Das StepOne™-System strahlt alle Wells der Reaktionsplatte innerhalb des StepOne-Systems aus, wodurch die Fluorophoren in jeder Reaktion angeregt werden.
2. **Emission**: Die Optik des StepOne™-Systems fokussiert die von den Wells der Reaktionsplatte abgegebene Restfluoreszenz. Das daraus resultierende, vom Gerät erfasste Bild, besteht nur aus dem Licht, eines Wellenlängenbereichs.
3. **Erfassung**: Das StepOne™-System erstellt daraus eine digitale Darstellung der über einen festgelegten Zeitraum erfassten Restfluoreszenz. Die StepOne™-Software speichert die Fluoreszenzrohdaten für die Analyse. Falls erforderlich, führt die Software zusätzliche Messungen durch, entsprechend der Anforderungen der für die Analyse verwendeten Fluoreszenzreagenzien.

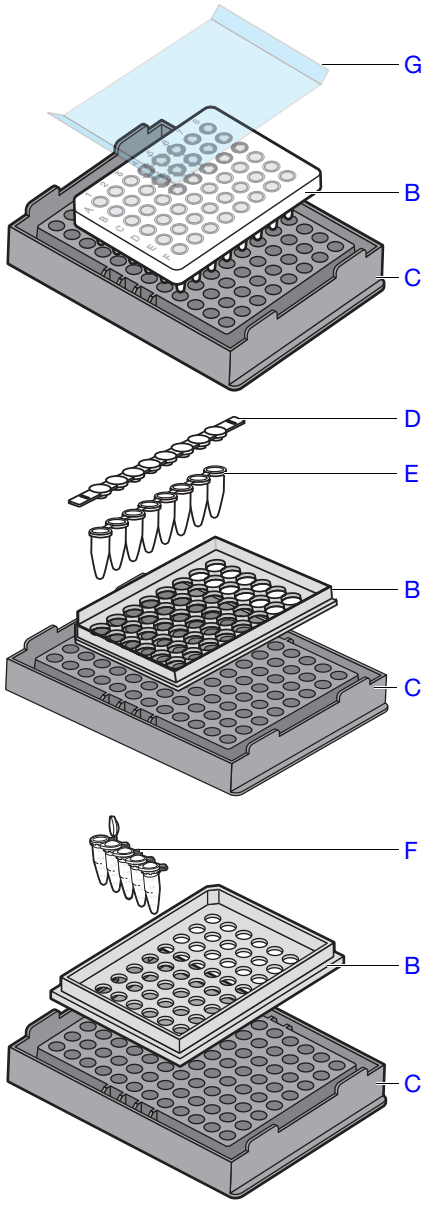
Nach Durchführung eines Laufs bestimmt die StepOne™-Software anhand von Kalibrierungsdaten (durch räumliche, Farbstoff- und Hintergrundkalibrierung) den Ort und die Intensität von Fluoreszenzsignalen in jeder Messung, den mit dem jeweiligen Fluoreszenzsignal verbundenen Farbstoff und die Aussagefähigkeit des Signals.

Hinweise

Unterstützte Assays und Verbrauchsmaterialien

Das StepOne™-System unterstützt Genotypisierungsanalysen, die Standardreagenzien und Protokolle verwenden, entweder mit MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates, MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips oder MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps und MicroAmp™ Fast 48-Well Trays.

WICHTIG! Verwenden Sie mit dem StepOne™-System ausschließlich Fast-Verbrauchsmaterialien (Reaktionsplatte, Reaktionsgefäßstreifen und Reaktionsgefäße), auch wenn Sie eine Analyse mit Standardreagenzien durchführen. Obwohl TaqMan® SNP Genotyping Assays nicht den Fast-Mastermix oder Fast-Protokolle verwenden, müssen Sie für die Durchführung Ihrer Genotypisierungsanalysen Fast-Verbrauchsmaterialien verwenden.



#	Verbrauchsmaterial
A	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates
B	MicroAmp™ Fast 48-Well Tray
C	MicroAmp™ 96-well Splash-free Support Base
D	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips
E	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips
F	MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps
G	MicroAmp Optical 48-Well Adhesive Film

Hinweise

Informationen zu Genotypisierungsanalysen

Endpunktanalysen

Genotypisierungsanalysen sind Endpunktanalysen. Bei Endpunktanalysen werden:

- die Daten am Ende des PCR-Prozesses erfasst.
- die Reaktionen durch die Menge der am Ende der PCR akkumulierten Zielsequenz charakterisiert (Saiki *et al*., 1985).
- Ein Datenpunkt entspricht der normalisierten Intensität des Reporter-Farbstoffs oder R_n.

Einige Endpunktanalysen enthalten auch Prä-PCR-Datenpunkte. In diesem Fall berechnet das System den Delta R_n (ΔR_n)-Wert anhand der folgenden Formel:

$$R_n(\text{post-PCR}) - R_n(\text{pre-PCR}) = \Delta R_n$$

Hinweis: In diesem Handbuch bezieht sich der Begriff *Analyse* auf den gesamten Prozess, vom Analysedesign bis zur Datenanalyse.

Einsatz von Echtzeit-PCR-Daten in Endpunktanalysen

Die StepOne™-Software bietet die Möglichkeit zur Erfassung von Echtzeit-Daten sowohl für Positiv/Negativ-Analysen als auch für Genotypisierungsanalysen. In dem Fall, dass eine Analyse fehlschlägt, können die Echtzeitdaten zur Bestimmung der Fehlerursache hilfreich sein.

Informationen zu TaqMan® SNP-Genotypisierungs-Assays

Ein Genotypisierungs-Assay erkennt Varianten einer einzelnen Nukleinsäuresequenz, ohne die Zielsequenz zu quantifizieren. Durch das Vorhandensein von zwei Sonden in jeder Reaktion können zwei mögliche Varianten eines Single Nucleotide Polymorphismen (SNP, Punktmutation) in einer Zielsequenz genotypisiert werden.

Jeder TaqMan® SNP Genotyping Assay besteht aus einem direkt einsetzbaren Reaktionsgefäß mit folgendem Inhalt:

- Zwei sequenzspezifische Primer für die Amplifikation des zu bestimmenden Polymorphismus
- Zwei allelspezifische TaqMan® MGB-Sonden zur Detektion der Allele des jeweils zu bestimmenden Polymorphismus

Hinweise

Informationen zu TaqMan® MGB-Sonden

Jede allelspezifische TaqMan® MGB-Sonde verfügt über die folgenden Eigenschaften:

- Einen Reporter-Farbstoff an ihrem 5′-Ende
  - Der Farbstoff VIC® befindet sich am 5′-Ende der Sonde für Allel 1.
  - Der Farbstoff FAM™ befindet sich am 5′-Ende der Sonde für Allel 2.

    Die mit VIC®-Farbstoff markierte Sonde für Allel 1 entspricht dem ersten Nukleotid innerhalb der eckigen Klammern der Kontextsequenz in der Assay-Informationsdatei (AIF), die im Lieferumfang enthalten ist. Die mit FAM™-Farbstoff markierte Sonde für Allel 2 entspricht dem zweiten Nukleotid innerhalb der eckigen Klammern der Kontextsequenz in der AIF. Für die Kontextsequenz ATCGATT[G/T]ATCC bindet die mit VIC®-Farbstoff markierte Sonde an das Allel 1, das G enthält, und die mit FAM™-Farbstoff markierte Sonde an das Allel 1, das T enthält.
- Einen Minor Groove Binder (MGB): Erhöht die Schmelztemperatur (T_m) für eine gegebene Sondenlänge und ermöglicht die Entwicklung kürzerer Sonden (Alfonina *et al.,* 1997, Kutyavin *et al.,* 1997). Die Verwendung kürzerer Sonden führt zu größeren Unterschieden in den T_m-Werten zwischen der passenden und der nicht passenden Sonde und somit zu einer stabileren Genotypisierung.
- Einen nicht fluoreszierenden Quencher (NFQ) an seinem 3′-Ende, der die Detektion der Fluoreszenz des Reporter-Farbstoff mit größerer Empfindlichkeit als mit einem fluoreszierenden Quencher ermöglicht.

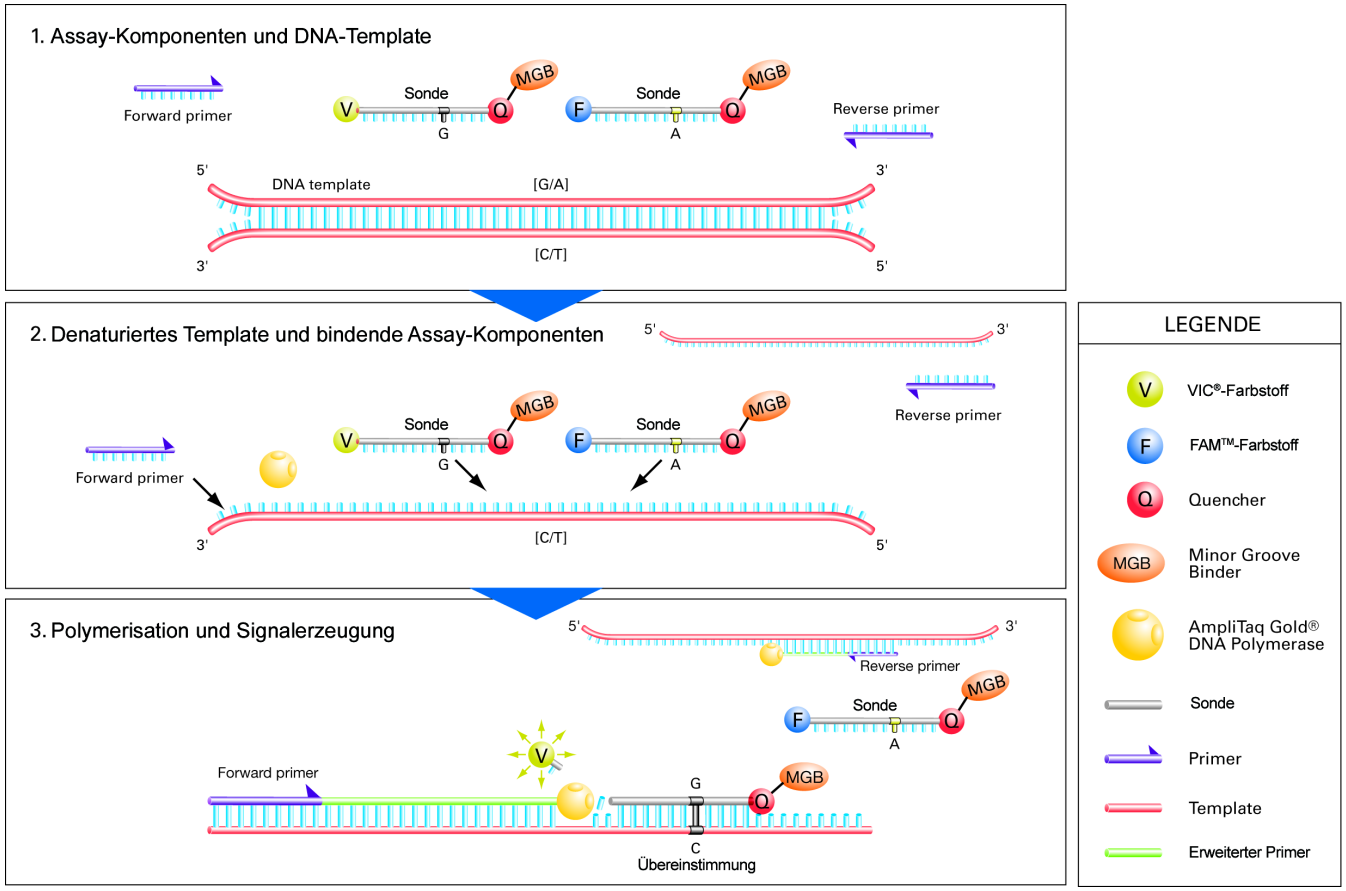
WICHTIG! Applied Biosystems empfiehlt nicht die Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne™-System.

5′ Nuklease-Assay

Die Abbildung unten ist eine schematische Darstellung des 5′ Nuklease-Assays. Während der PCR geschieht Folgendes:

- Jede TaqMan® MGB-Sonde bindet spezifisch an die entsprechende Komplementärsequenz zwischen Forward- und Reverse-Primer.
- Solange die Oligonukleotid-Sonde intakt ist, wird das Reportersignal durch die Nähe des Quenscher-Farbstoffs zum Reporter-Farbstoff gequenscht.
- AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase verlängert die Primer, die an das genomische DNA-Template gebunden sind.
- AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase (eine 5′-Nuklease) schneidet die Sonden, die stabil an der Zielsequenz hybridisiert sind.
- Durch die Aufspaltung der an der Zielsequenz hybridisierten Sonden wird der Reporter vom Quencher entfernt und die Fluoreszenz des Reporters steigt an. Das durch die PCR-Amplifikation generierte Fluoreszenzsignal zeigt an, welche Allele in der Sonde vorkommen.

Hinweise



Unspezifische Fluoreszenz minimieren

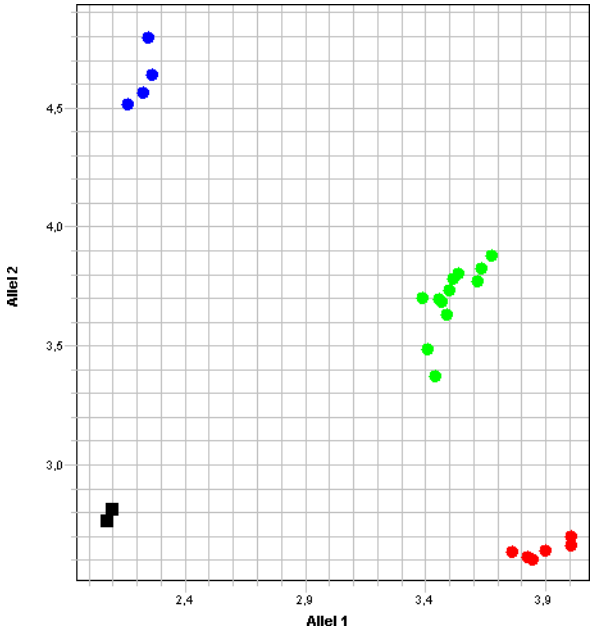
Bei TaqMan®-Assays wird die Fluoreszenz von unspezifisch gebundenen Sonden verringert, weil Nukleotidfehlpaarungen zwischen einer Sonde und einer Sequenz die Wahrscheinlichkeit verringern, dass die Sonde gespalten wird. Die kürzeren Sondenlängen haben zur Folge, dass eine Nichtübereinstimmung eines Basenpaares größere negative Auswirkungen auf die Bindung hat. Die nicht übereinstimmende Sonde bindet nicht fest an das Allel, so dass die AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase die nicht passende Sonde abdrängt, ohne den Reporter-Farbstoff abzuspalten.

Platten lesen und auswerten

Die StepOne™-Software genotypisiert die DNA-Proben einer Reaktionsplatte gleichzeitig. Zuerst normalisiert die Software die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs auf die Fluoreszenz des passiven Referenz-Farbstoffs in jedem Well. Anschließend plottet die Software die normalisierten Intensitäten (R_n) der Reporter-Farbstoffe in jedem Proben-Well auf dem Alleldiskriminierungsplot, welcher die Reporter-Farbstoff-Intensitäten der allelspezifischen Sonden vergleicht. Schließlich fügt die StepOne™-Software die Probendaten algorithmisch in Clustern zusammen und ordnet den Proben eines jeden Clusters je nach Position im Plot eine Genotypenbestimmung zu.

Hinweis: Der Clustering-Algorithmus der StepOne™-Software nimmt keine Genotypenbestimmung vor, wenn in einer Analyse nur ein Genotyp vorkommt.

Hinweise



Die Clusterbildung von Datenpunkten kann entlang der horziontalen Axe (Allel 1), vertikalen Achse (Allel 2) oder diagonal (Allel 1/Allel 2) variieren. Die Variation entsteht aus Differenzen in dem Ausmaß der Fluoreszenzintensität des Reporter-Farbstoffs nach der PCR-Amplifikation. In der Tabelle unten ist die Korrelation zwischen Fluoreszenzsignalen und Sequenzen in einer Probe dargestellt.

Ein deutlicher Anstieg der...	zeigt...
VIC®-Farbstoff markierten Sondenfluoreszenz	Homozygotie für Allel 1
FAM™-Farbstoff markierten Sondenfluoreszenz	Homozygotie für Allel 2
VIC®- als auch FAM™-Farbstoff markierten Sondenfluoreszenz	Allel 1-Allel 2 Heterozygotie

Hinweise

Verwendung dieses Handbuchs

Verwendung des Handbuchs als Tutorial

Anhand der mit der StepOne™-Software gelieferten Beispielanalysedaten können Sie dieses Handbuch als Tutorial für die Durchführung einer Genotypisierungs-Analyse mit dem StepOne™-System verwenden. Befolgen Sie die Anweisungen in den Kapiteln 2 bis 5:

- Kapitel 2: Erstellen der Analyse mithilfe des Analysedesign-Assistenten der Software
- Kapitel 3: Vorbereiten der Analyse anhand der vom Analysedesign-Assistenten in Kapitel 2 berechneten Reagenzien und Volumina
- Kapitel 4: Durchführen der Analyse auf einem StepOne™-System.
- Kapitel 5: Auswerten der Ergebnisse

Weitere Informationen finden Sie unter „Informationen zur Beispielanalyse“ auf Seite 9.

Anhand der mit der StepOne™-Software gelieferten Beispielanalysedaten können Sie dieses Handbuch als Tutorial für die Durchführung einer Genotypisierungs-Analyse mit dem StepOne™-System verwenden. Befolgen Sie die Anweisungen in den jeweiligen Kapiteln:

Kapitel	Verfahren
2	Erstellen Sie das Analysedesign unter Verwendung des Analysedesign-Assistenten in der StepOne™-Software.
3	Bereiten Sie die Analyse vor und verwenden Sie dafür die vom Analysedesign-Assistenten in Kapitel 2 berechneten Reagenzien und Volumina.
4	Führen Sie die Analyse auf einem StepOne™-System durch.
5	Werten Sie die Ergebnisse aus.

Weitere Informationen finden Sie unter „Informationen zur Beispielanalyse“ auf Seite 9.

Hinweise

Anwendung des Handbuchs für Ihre eigene Analysen

Nach Abschluss der Tutorial-Übungen in den Kapiteln 2 bis 5 dient dieses Handbuch als Anleitung für den Arbeitsablauf mit dem Analysedesign-Assistenten für Ihre eigenen Genotypisierungsanalysen. Alle Verfahren in den Kapiteln 2 bis 5 enthalten eine Reihe an Hinweisen mit Informationen über die Ausführung der verschiedenen Aktionen für Ihre eigenen Analysen. Außerdem können Sie einen der anderen von der StepOne™-Software angebotenen Arbeitsabläufe zur Ausführung Ihrer eigenen Analysen verwenden. Die unten stehende Tabelle bietet einen Überblick über alle von der StepOne™-Software angebotenen Arbeitsabläufe.

Arbeitsablauf	Beschreibung	Siehe...
Analysedesign-Assistent	Der Assistent führt Sie durch bewährte Schritte zur Eingabe Ihrer eigenen Analyseparameter.	Kapitel 2
Setup für Fortgeschrittene	Richten Sie eine neue und auf Ihrem eigenen Design basierende Analyse ein. Diese Funktion bietet erfahrenen Anwendern Flexibilität beim Design.	Seite 102
QuickStart	Führen Sie eine neue Analyse ohne Informationen über die Platteneinrichtung durch.	Seite 107
Template	Richten Sie eine neue Analyse mithilfe der Einrichtungsinformationen einer Vorlage (Templates) ein.	Seite 112
Export/Import	Importieren Sie Analysedesigns aus ASCII-Textdateien, die Informationen über die Analyseeinrichtung enthalten.	Seite 113

Informationen zur Beispielanalyse

Zur Veranschaulichung, wie Genotypisierunganalysen durchgeführt werden, führt Sie dieses Handbuch durch die einzelnen Verfahren zur Erstellung, Vorbereitung und Auswertung anhand einer Beispielanalyse. Die Beispielanalyse stellt eine typische Analyse dar,mit deren Hilfe Sie sich schnell mit dem StepOne™-System vertraut machen können.

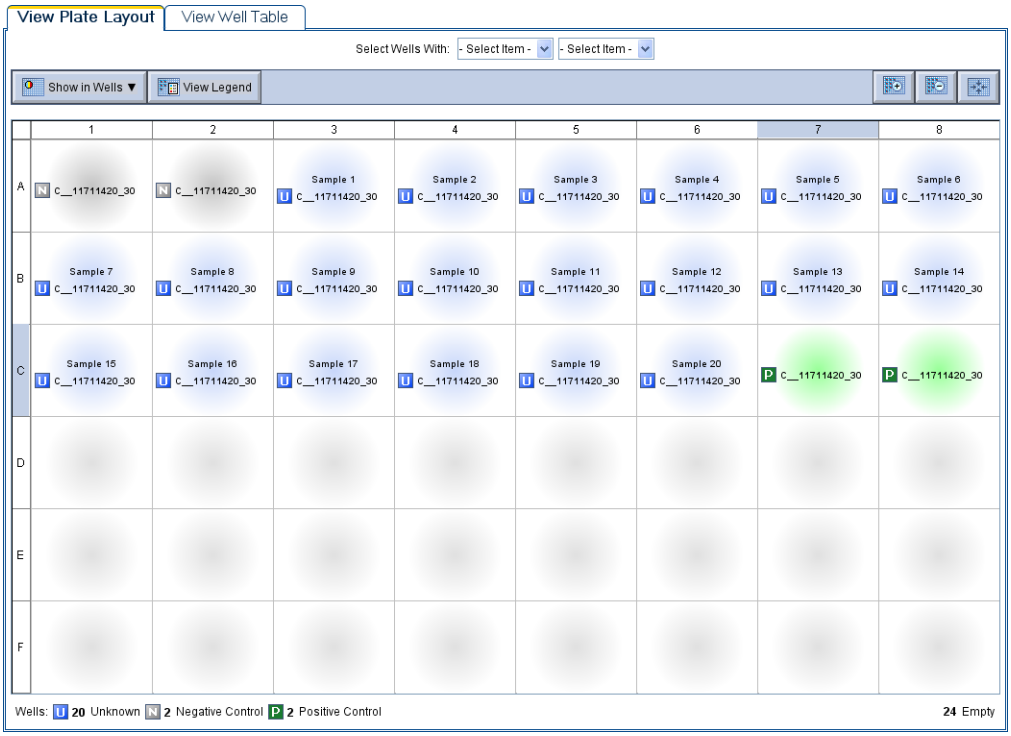
Beschreibung

Das Ziel der Genotypisierungs-Beispielanalyse ist, SNP rs8039 zu untersuchen. Mögliche Genotypen sind AA, AC und CC. In dem Beispiel wurden 20 unbekannte genomische DNA (gDNA)-Proben mithilfe des TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay ID C__11711420_30 genotypisiert. Die Reaktionen wurden so eingerichtet, dass die PCR-Primer und -Sonden, die auf beide Allele des SNP rs8039 abzielen, in demselben Well vorhanden waren. Die PCR wurde mithilfe des TaqMan® Universal PCR Master Mix durchgeführt und entsprechend des unter *Performing a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card* (BN 4367636A) beschriebenen Protokolls ausgeführt.

Hinweise

Reaktionsplatten-belegung

Die Reaktionsplattenbelegung der Beispielanalyse ist im Folgenden dargestellt.


View Plate Layout
View Well Table
Select Wells With:
- Select Item -
- Select Item -
Show in Wells
View Legend
1 2 3 4 5 6 7 8
A B C D E F
Wells: U 20 Unknown N 2 Negative Control P 2 Positive Control
24 Empty

Informationen zu den Beispiel-daten

Die in diesem Handbuch enthaltene Beispielanalyse ist in der StepOne™-Software enthalten. Sie finden die Analysedatei (Genotyping Example.eds) auf Ihren Computer unter:

<drive (Laufwerk)>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples

wobei *<drive (Laufwerk)>* für das Computerlaufwerk steht, auf dem die StepOne™-Software installiert wurde. Das Standardinstallationslaufwerk ist C.

Hinweise

Arbeitsablauf der Beispielanalyse

Informationen zum Arbeitsablauf der Analyse

In der folgenden Abbildung ist der Arbeitsablauf der Genotypisierungs-Beispielanalyse dargestellt.

Analyse starten

Experimentelles Design (Kapitel 2)

1. Legen Sie eine neue Analyse an.
2. Legen Sie die Analyseeigenschaften fest.
3. Legen Sie die Methoden und Materialien fest.
4. Definieren Sie die SNP-Assays.
5. Definieren Sie die Proben und Replikate.
6. Definieren Sie das Laufprofil.
7. Überprüfen Sie das Pipettierprotokoll.
8. Bestellen Sie Materialien für die Analyse.
9. Beenden Sie den Analysedesign-Assistenten.

Ansetzen der Reaktionen (Kapitel 3)

1. Setzen Sie die Probenverdünnungen an.
2. Setzen Sie den Reaktionsmix an.
3. Bereiten Sie die Reaktionsplatte vor.

Analysedurchführung (Kapitel 4)

1. Bereiten Sie den Lauf vor.
2. Aktivieren Sie die Benachrichtigungen (optional).
3. Starten Sie den Lauf.
4. Überwachen Sie den Lauf.
5. Entladen Sie die Reaktionsplatte, und übertragen Sie die Daten.

Analyseauswertung (Kapitel 5)

1. Ansicht der Alleldiskriminierungsplot
2. Ansicht der Plattenbelegung
3. Ansicht der Well-Tabelle
4. Ansicht der QC-Zusammenfassung
5. Ansicht der Rohdatendarstellung
6. Ansicht der Multikomponentendarstellung
7. Ansicht der Amplifikationsdarstellung
8. Ansicht der Auswertungseinstellungen
9. Daten auswerten

Analyse beenden

Hinweise

Hinweise

2 Experimentelles Design

Dieses Kapitel umfasst die folgenden Themen:

- Kapitelübersicht 14
- Anlegen einer neuen Analyse 15
- Definieren der Analyseeigenschaften 16
- Definieren der Methoden und Materialien 18
- Definieren der SNP-Assays 20
- Definieren der Proben und Replikate 23
- Definieren des Laufprofils 25
- Überprüfen des Pipettierprotokolls 27
- Bestellen von Materialien für die Analyse 29
- Beenden des Analysedesign-Assistenten 32

Hinweis: Weitere Informationen über ein Thema dieses Handbuchs finden Sie in der Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software, indem Sie entweder **F1** drücken, in der Symbolleiste auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

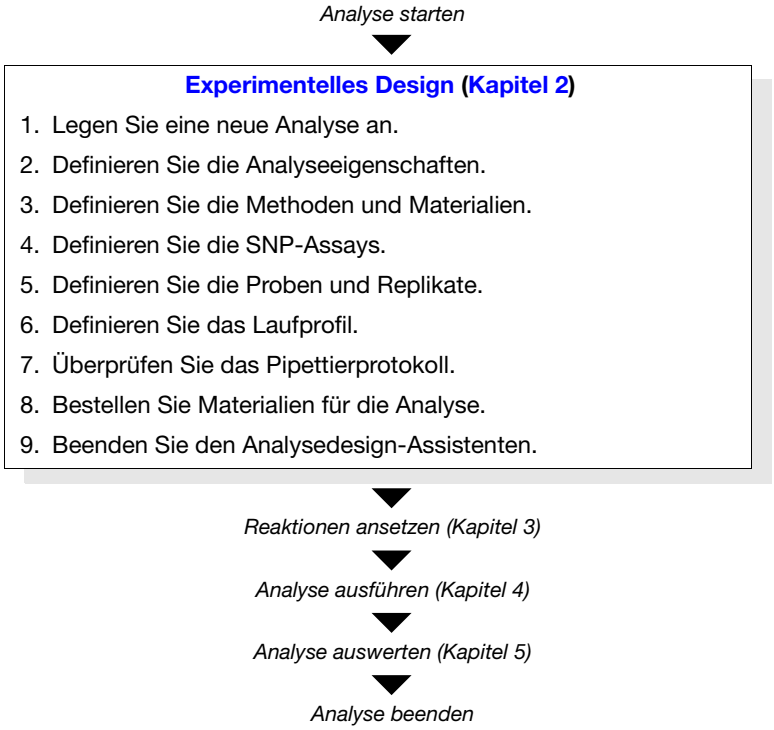
Hinweise

Kapitelübersicht

In diesem Kapitel wird erklärt, wie der Analysedesign-Assistent zur Einrichtung der Genotypisierungs-Beispielanalyse verwendet werden kann. Der Analysedesign-Assistent führt Sie während der Einrichtung durch bewährte Verfahren.

Arbeitsablauf

Richten Sie die Analyse nach dem folgenden Arbeitsablauf ein:


Analyse starten
Experimentelles Design (Kapitel 2)
1. Legen Sie eine neue Analyse an.
2. Definieren Sie die Analyseeigenschaften.
3. Definieren Sie die Methoden und Materialien.
4. Definieren Sie die SNP-Assays.
5. Definieren Sie die Proben und Replikate.
6. Definieren Sie das Laufprofil.
7. Überprüfen Sie das Pipettierprotokoll.
8. Bestellen Sie Materialien für die Analyse.
9. Beenden Sie den Analysedesign-Assistenten.
Reaktionen ansetzen (Kapitel 3)
Analyse ausführen (Kapitel 4)
Analyse auswerten (Kapitel 5)
Analyse beenden

Hinweis: Dieser -Arbeitsablauf stellt nur einen von verschiedenen Arbeitsabläufen dar, die von der StepOne™-Software für die Einrichtung von Genotypisierungsanalysen verwendet werden. Weitere Informationen finden Sie unter „Anwendung des Handbuchs für Ihre eigene Analysen“ auf Seite 9.

Hinweise

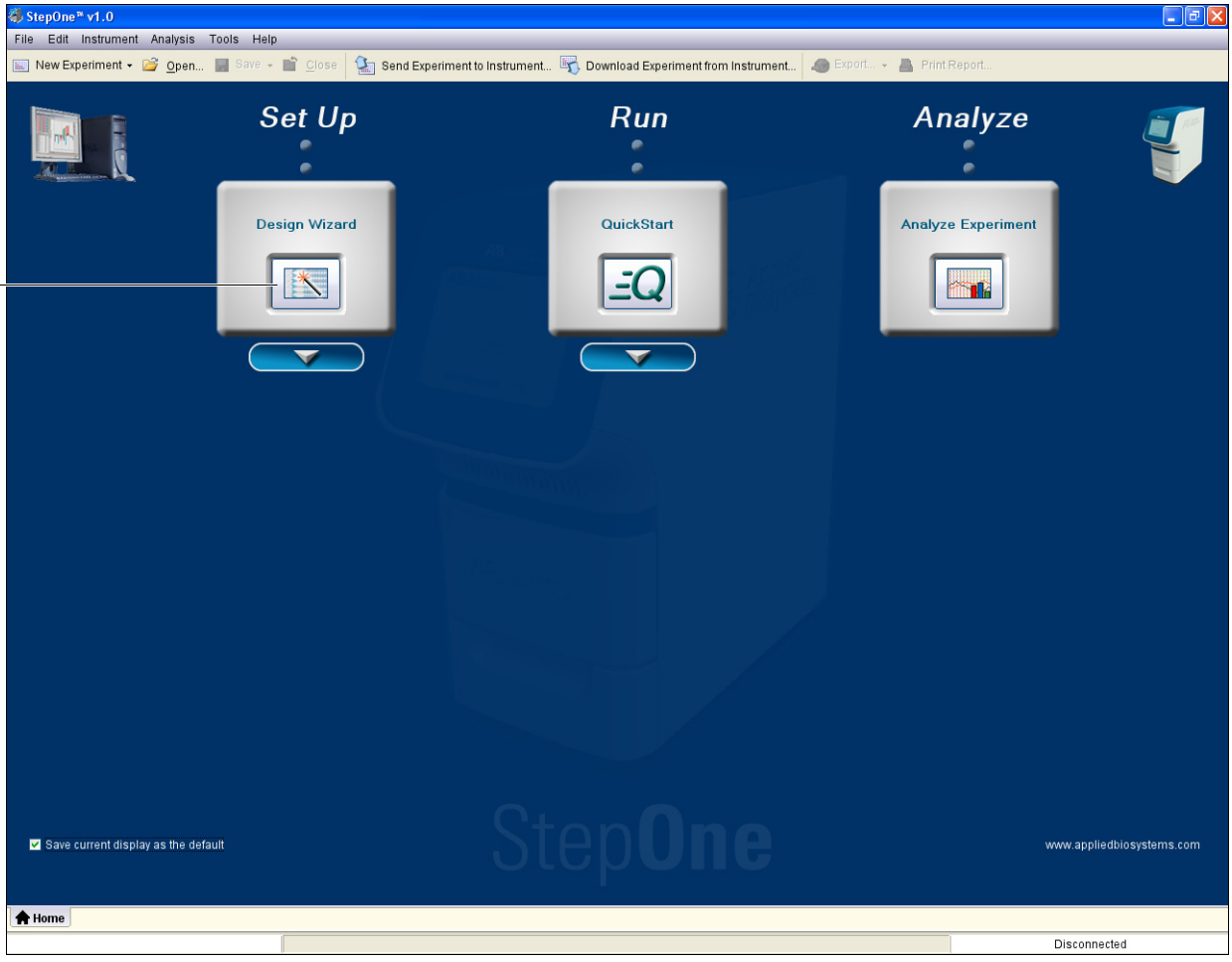
Anlegen einer neuen Analyse

Starten Sie die StepOne™-Software und öffnen Sie anschließend zur Erstellung einer neuen Genotypisierungsanalyse den Analysedesign-Assistenten.

Analyse anlegen

1. Doppelklicken Sie auf , oder wählen Sie **Start** ▸ **All Programs** (Alle Programme) ▸ **Applied Biosystems** ▸ **StepOne** ▸ **StepOne v1.0**, um die StepOne™-Software zu starten.
2. Klicken Sie im Bildschirm Home (Startseite) auf **Design Wizard** (Analysedesign-Assistent), um den Analysedesign-Assistenten aufzurufen.

Hinweis: Zum Anlegen einer neuen Analyse mithilfe des Setups für Fortgeschrittene, einer Analysevorlage oder dem QuickStart-Verfahren siehe Anhang A, „Alternative Analyseabläufe“, auf Seite 101.



Weitere Informationen

Weitere Informationen finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

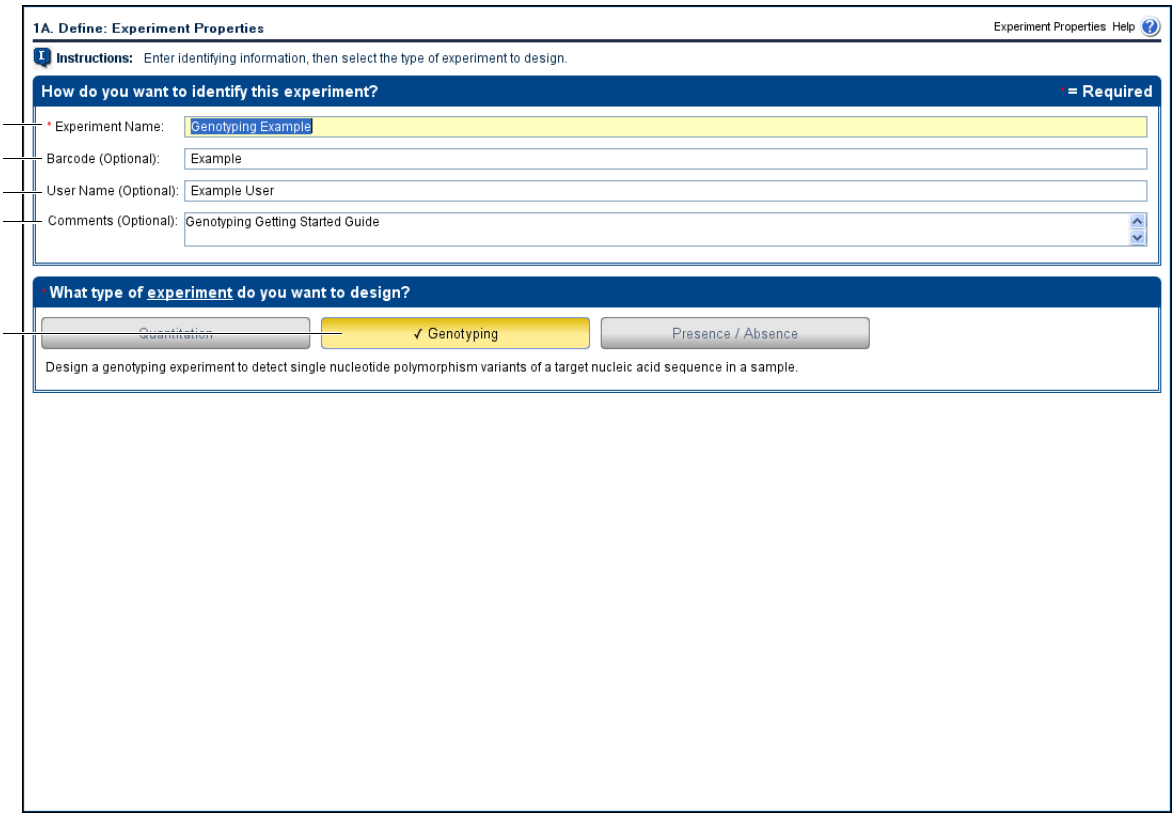
Hinweise

Definieren der Analyseeigenschaften

Geben Sie im Bildschirm Experiment Properties (Analyseeigenschaften) kennzeichnende Angaben für die Analyse ein, und wählen Sie dann den Analysetyp, den Sie einrichten wollen.

Bildschirm vervollständigen

1. Klicken Sie in das Feld **Experiment Name** (Analysename), und geben Sie dann **Genotyping Example** (Genotypisierungs-Beispielanalyse) ein.
2. Klicken Sie in das Feld **Barcode**, geben Sie dann das **Example** (Beispiel) ein.
3. Klicken Sie in das Feld **User Name** (Benutzername), geben Sie dann den **Example User** (Beispielbenutzer) ein.
4. Klicken Sie in das Feld **Comments** (Anmerkungen), geben Sie dann **Genotyping Getting Started Guide** (Einführungshandbuch zur Genotypisierung) ein.
5. Wählen Sie als Analysetyp **Genotyping** (Genotypisierung) aus.
6. Klicken Sie auf **Next >** (Weiter).



Hinweise

Einrichtungshinweise

Beachten Sie beim Einrichten Ihres eigenen Analysedesigns Folgendes:

- Geben Sie einen Analysenamen ein, der beschreibenden Charakter hat und sich leicht merken lässt.
- (*Optional*) Geben Sie einen Barcode von bis zu 100 Zeichen ein, damit die in der Analyse verwendete Reaktionsplatte eindeutig gekennzeichnet ist.
- (*Optional*) Geben Sie zur Identifizierung des Verantwortlichen für die Analyse einen Benutzernamen ein.
- Wählen Sie als Analysetyp **Genotyping** (Genotypisierung) aus.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zum Vervollständigen des Bildschirms mit den Analyseeigenschaften finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Hinweise

Definieren der Methoden und Materialien

Auf dem Bildschirm zur Eingabe der Methoden und Materialien legen Sie Folgendes fest:

- die für die Genotypisierung von Proben verwendeten Reagenzien
- den Zustand der zu genotypisierenden DNA-Template (flüssig oder trocken)
- die für die PCR-Reaktionen geeignete Heiz-/Kühlgeschwindigkeit (Ramp Speed)
- in die Methode aufzunehmede Stufen

Informationen zur Beispielanalyse

In der Beispielanalyse werden TaqMan®-Reagenzien und in den PCR-Reaktionen flüssige genomische DNA (gDNA)-Templates verwendet. Da in den Reaktionen keine TaqMan® Fast-Reagenzien enthalten sind, führt das StepOne™-System den Lauf in Standardgeschwindigkeit durch. Da das StepOne™-System außerdem die thermische Wechselbelastung für die PCR ausführt, besteht das Laufprofil für die Analyse aus den Stadien Prä-PCR-Messung, Amplifikation und Post-PCR-Messung.

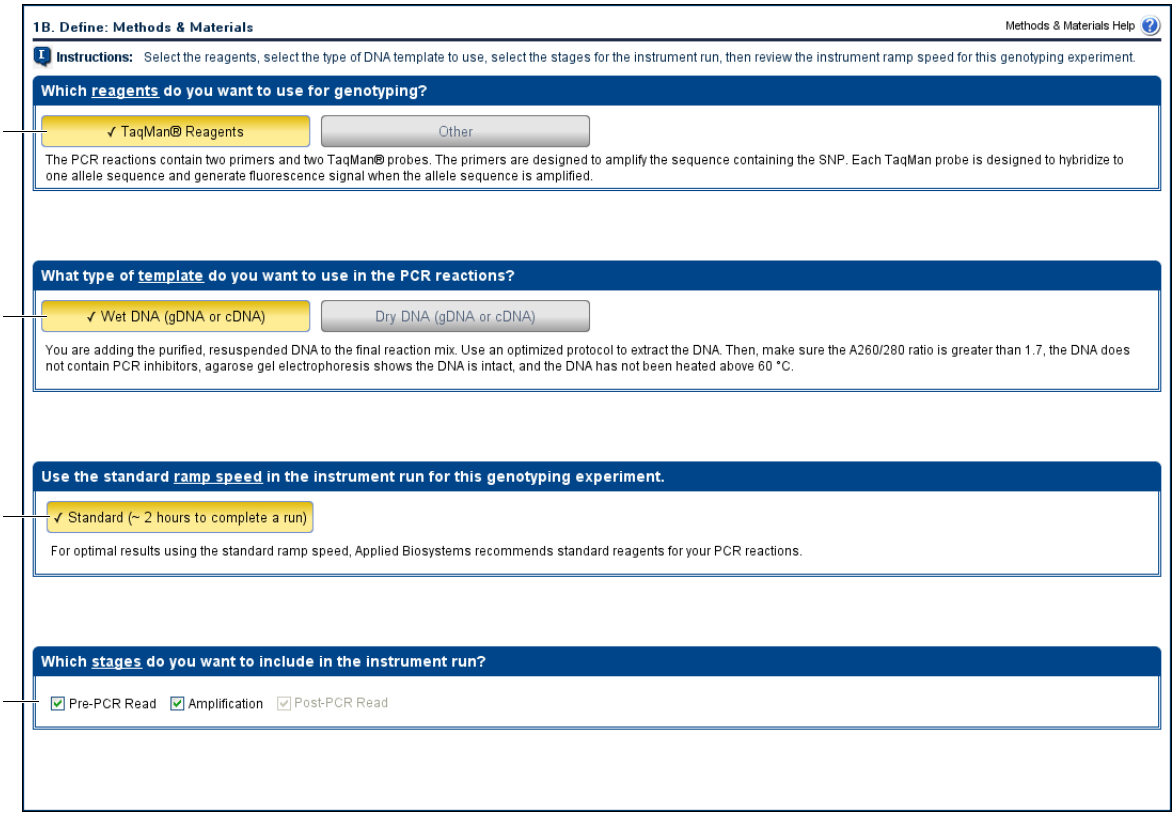
Bildschirm vervollständigen

1. Wählen Sie als Reagenzien **TaqMan® Reagents** aus.
2. Wählen Sie als Template-Typ **Wet DNA (gDNA or cDNA) [flüssige DNA (gDNA oder cDNA)]** aus.
3. Wählen Sie als Heiz-/Kühlgeschwindigkeit **Standard (~2 hours to complete a run)** [Standard (ca. 2 Stunden für einen Lauf)] aus.
4. Wählen Sie **Pre-PCR Read** (Prä-PCR-Messung) und **Amplification** (Amplifikation), um diese Stufen zur Methode hinzuzufügen.

   Hinweis: Die Post-PCR-Messung ist obligatorisch.

5. Wählen Sie **Next >** (Weiter).

Hinweise


1B. Define: Methods & Materials
Methods & Materials Help
Instructions: Select the reagents, select the type of DNA template to use, select the stages for the instrument run, then review the instrument ramp speed for this genotyping experiment.
Which reagents do you want to use for genotyping?
✓ TaqMan® Reagents
Other
The PCR reactions contain two primers and two TaqMan® probes. The primers are designed to amplify the sequence containing the SNP. Each TaqMan probe is designed to hybridize to one allele sequence and generate fluorescence signal when the allele sequence is amplified.
What type of template do you want to use in the PCR reactions?
✓ Wet DNA (gDNA or cDNA)
Dry DNA (gDNA or cDNA)
You are adding the purified, resuspended DNA to the final reaction mix. Use an optimized protocol to extract the DNA. Then, make sure the A260/280 ratio is greater than 1.7, the DNA does not contain PCR inhibitors, agarose gel electrophoresis shows the DNA is intact, and the DNA has not been heated above 60 °C.
Use the standard ramp speed in the instrument run for this genotyping experiment.
✓ Standard (~ 2 hours to complete a run)
For optimal results using the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends standard reagents for your PCR reactions.
Which stages do you want to include in the instrument run?
Pre-PCR Read
Amplification
Post-PCR Read
1
2
3
4

Einrichtungshinweise

Beachten Sie beim Einrichten Ihres eigenen Analysedesigns Folgendes:

- Wählen Sie **Other** (Sonstige), falls Sie nicht TaqMan®-Reagenzien zur Amplifikation und Detektion von Zielsequenzen in Ihrer Analyse verwenden.

  Hinweis: Bei Auswahl von **Other** wird der Bildschirm für das Pipettierprotokoll nicht angezeigt.

- Wenn Sie statt genomischer DNA (gDNA) bzw. cDNA eine andere Vorlage verwenden, wählen Sie die Option (**Wet DNA** bzw. **Dry DNA**), die den Zustand Ihrer Proben beschreibt.
- Wählen Sie als Heiz-/Kühlgeschwindigkeit für den Gerätelauf **Standard** aus.

  WICHTIG! TaqMan® SNP-Genotypisierungsassays unterstützen keine Fast-Reagenzien. Folglich unterstützt der Analysedesign-Assistent für Genotypisierungsanalysen die Heiz-/Kühlgeschwindigkeit Fast nicht. Wenn Sie mit Fast-Geschwindigkeiten arbeiten möchten, richten Sie Ihre Genotypisierungsanalyse mithilfe des Arbeitsablaufs für Fortgeschrittene ein.

Hinweise

- Falls Sie die PCR-Amplifikation mit einem anderen als dem im StepOne™-System enthaltenen Thermocycler durchführen möchten, deaktivieren Sie die Option **Amplification** (Amplifikation).

Hinweis: Die Prä-PCR-Messung ist nicht obligatorisch, wird jedoch empfohlen. Die StepOne™-Software verwendet die Prä-PCR-Messung zur Normalisierung der Post-PCR-Daten.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zum Vervollständigen des Bildschirms Methoden und Materialien finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Definieren der SNP-Assays

Geben Sie im Bildschirm Set Up SNP Assays (Definieren der SNP-Assays) die Anzahl der für die Analyse verwendeten SNP-Assays ein und legen Sie anschließend die Eigenschaften für die jeweiligen SNP-Assays fest.

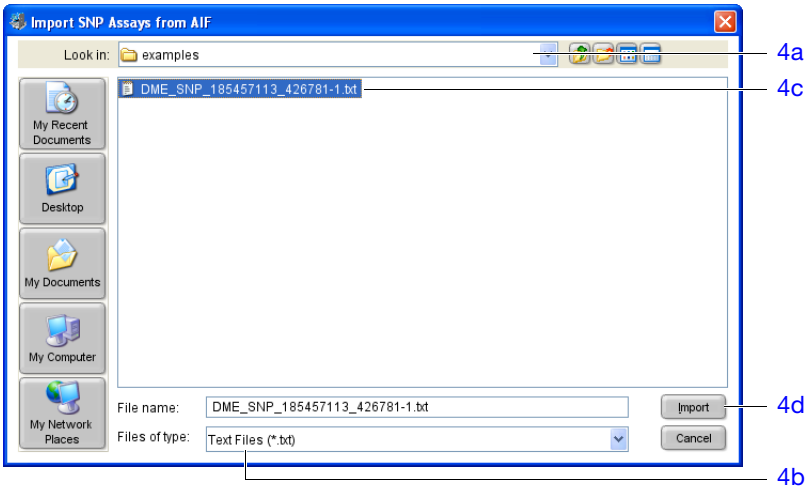
Informationen zur Beispielanalyse

In der Beispielanalyse werden Proben für SNP rs8039 ausgewertet. Da es sich hierbei um einen TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay (Assay ID C__11711420_30) handelt, können die Daten zum SNP-Assay aus der im Lieferumfang enthaltenen bzw. von der Website von Applied Biosystems heruntergeladenen Assay-Informationsdatei (AIF) importiert werden.

Bildschirm SNP Assays vervollständigen

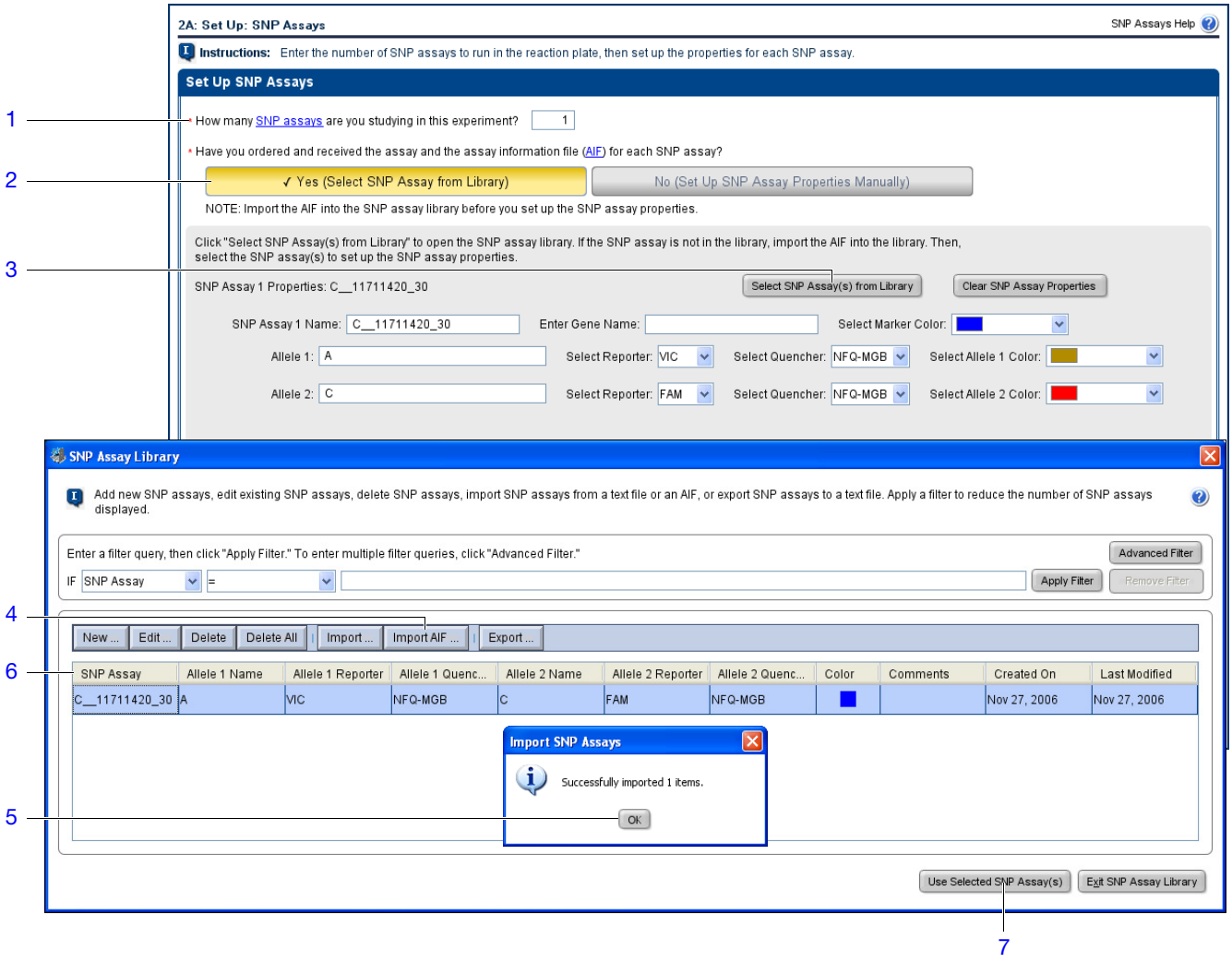
1. Geben Sie für die Anzahl der zu untersuchenden SNP-Assays eine **1** ein.
2. Klicken Sie auf **Yes (Select SNP Assay from SNP Assay Manager)** (Ja – SNP-Assay aus SNP Assay Manager wählen)
3. Klicken Sie auf **Select SNP Assay(s) from Library** (SNP-Assays aus Bibliothek wählen).
4. Klicken Sie auf **Import AIF** (AIF importieren) und importieren Sie den SNP-Assay aus der AIF mithilfe des Dialogfelds SNP Assays from AIF:
   a. Gehen Sie zu:
      <*Laufwerk*>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples
   b. Wählen Sie aus dem Dropdown-Menü der Dateitypen **Text Files (*.txt)**.
   c. Wählen Sie **DME_SNP_185457113_426781-1.txt**.
   d. Klicken Sie auf **Import**.

Hinweise



5. Klicken Sie im Dialogfeld SNP Import Properties (SNP Importeigenschaften) auf **OK**.
6. Wählen Sie den SNP-Assay **C__11711420_30**.
7. Klicken Sie auf **Use Selected Marker(s)** (ausgewählte Marker verwenden).
8. Wählen Sie **Next >** (Weiter).

Hinweise


2A: Set Up: SNP Assays
SNP Assays Help
Instructions: Enter the number of SNP assays to run in the reaction plate, then set up the properties for each SNP assay.
Set Up SNP Assays
How many SNP assays are you studying in this experiment? 1
Have you ordered and received the assay and the assay information file (AIF) for each SNP assay?
✓ Yes (Select SNP Assay from Library)
No (Set Up SNP Assay Properties Manually)
NOTE: Import the AIF into the SNP assay library before you set up the SNP assay properties.
Click "Select SNP Assay(s) from Library" to open the SNP assay library. If the SNP assay is not in the library, import the AIF into the library. Then, select the SNP assay(s) to set up the SNP assay properties.
SNP Assay 1 Properties: C__11711420_30
Select SNP Assay(s) from Library
Clear SNP Assay Properties
SNP Assay 1 Name: C__11711420_30
Enter Gene Name:
Select Marker Color:
Allele 1: A
Select Reporter: VIC
Select Quencher: NFQ-MGB
Select Allele 1 Color:
Allele 2: C
Select Reporter: FAM
Select Quencher: NFQ-MGB
Select Allele 2 Color:
SNP Assay Library
Add new SNP assays, edit existing SNP assays, delete SNP assays, import SNP assays from a text file or an AIF, or export SNP assays to a text file. Apply a filter to reduce the number of SNP assays displayed.
Enter a filter query, then click "Apply Filter." To enter multiple filter queries, click "Advanced Filter."
Advanced Filter
IF SNP Assay =
Apply Filter
Remove Filter
New ...
Edit ...
Delete
Delete All
Import ...
Import AIF ...
Export ...
SNP Assay
Allele 1 Name
Allele 1 Reporter
Allele 1 Quenc...
Allele 2 Name
Allele 2 Reporter
Allele 2 Quenc...
Color
Comments
Created On
Last Modified
C__11711420_30
A
VIC
NFQ-MGB
C
FAM
NFQ-MGB
Nov 27, 2006
Nov 27, 2006
Import SNP Assays
Successfully imported 1 items.
OK
Use Selected SNP Assay(s)
Exit SNP Assay Library
1
2
3
4
5
6
7

Einrichtungshinweise

Beachten Sie beim Definieren Ihres eigenen Analysedesigns Folgendes:

- Applied Biosystems empfiehlt, nicht mehr als sechs SNPs auf einer Reaktionsplatte auszuwerten.

  Hinweis: Der Analysedesign-Assisten lässt nicht mehr als zwei SNPs pro Platte zu. Bei den Arbeitsabläufen Advanced Setup oder Quickstart ist die Anzahl der auszuwertenden SNPs nicht eingeschränkt.

- Kennzeichnen Sie jeden SNP-Assay mit einem eindeutigen Namen und einer Farbe.
- Falls Sie den SNP-Assay nicht manuell einrichten, vergewissern Sie sich, dass die zum jeweiligen Allel zugewiesenen Reporter-Farbstoffe richtig sind.

  WICHTIG! Applied Biosystems empfiehlt nicht die Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne™-System.

Hinweise

Weitere Informationen

Weitere Informationen zum Bildschirm SNP Assays finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Definieren der Proben und Replikate

Geben Sie im Bildschirm Set Up Samples and Replicates (Proben und Replikate einrichten) die zu analysierende Anzahl der Proben, die Probennamen und anschließend die Anzahl der Positiv- und Negativkontrollen ein.

Informationen zur Beispielanalyse

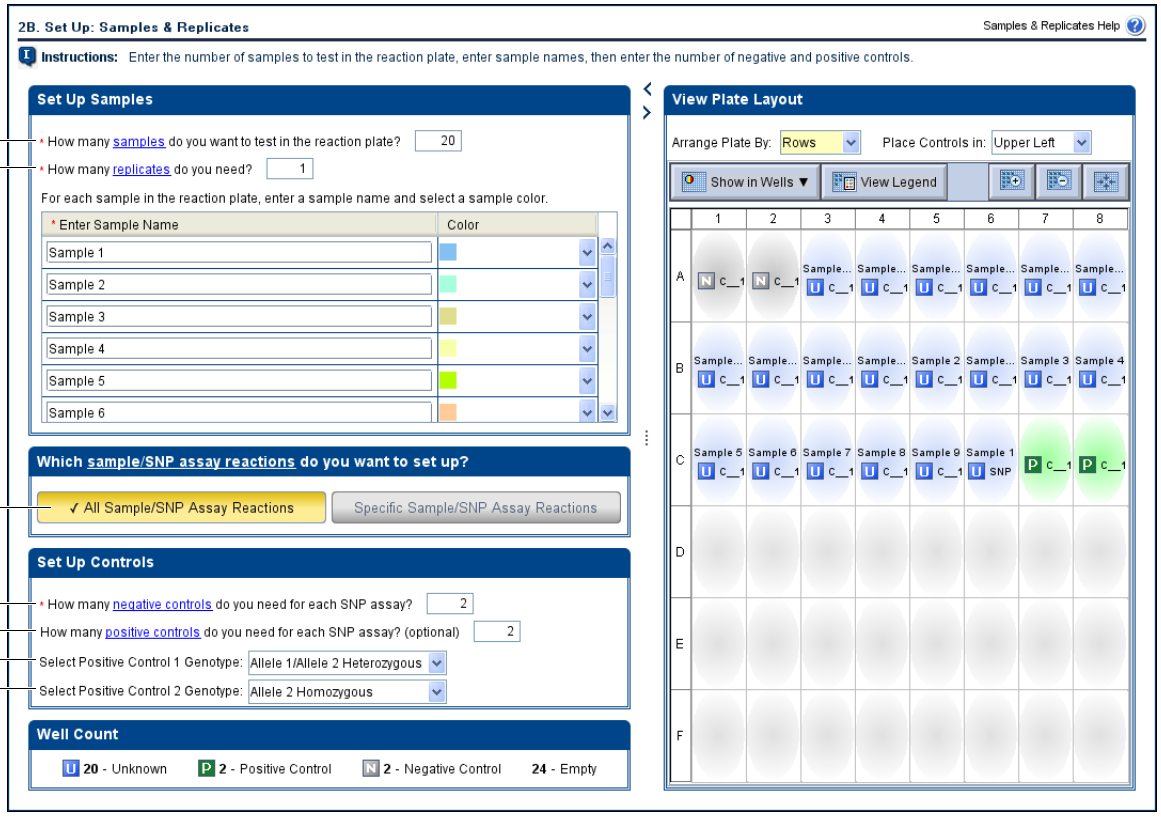
In der Beispielanalyse wird Folgendes ausgewertet:

- 20 unbekannte Proben
- 2 Negativkontrollen
- 2 Positivkontrollen (eine Heterozygotie und eine Allel 2-Homozygotie)

Bildschirm Samples and Replicates vervollständigen

1. Geben Sie als Anzahl der Proben **20** ein.
2. Geben Sie als Anzahl der Replikate **1** ein.
3. Klicken Sie auf **All Sample/ SNP Assay Reactions** (Alle Proben/SNP-Assay-Reaktionen).
4. Geben Sie als Anzahl der Negativkontrollen (Wells, die kein Template enthalten) **2** ein.
5. Geben Sie als Anzahl der Positivkontrollen (Wells, die Proben bekannter Genotypen enthalten) **2** ein.
6. Wählen Sie als Positivkontrolle 1 **Allele 1/Allele 2 Heterozygous** (Allel 1/Allel 2 heterozygot).
7. Wählen Sie als Positivkontrolle 2 **Allele 2 Homozygous** (Allel 2 homozygot).
8. Wählen Sie **Next >** (Weiter).

Hinweise


2B. Set Up: Samples & Replicates
Samples & Replicates Help
Instructions: Enter the number of samples to test in the reaction plate, enter sample names, then enter the number of negative and positive controls.
Set Up Samples
1 * How many samples do you want to test in the reaction plate? 20
2 * How many replicates do you need? 1
For each sample in the reaction plate, enter a sample name and select a sample color.
* Enter Sample Name
Color
Sample 1
Sample 2
Sample 3
Sample 4
Sample 5
Sample 6
Which sample/SNP assay reactions do you want to set up?
3 ✓ All Sample/SNP Assay Reactions
Specific Sample/SNP Assay Reactions
Set Up Controls
4 * How many negative controls do you need for each SNP assay? 2
5 How many positive controls do you need for each SNP assay? (optional) 2
6 Select Positive Control 1 Genotype: Allele 1/Allele 2 Heterozygous
7 Select Positive Control 2 Genotype: Allele 2 Homozygous
Well Count
20 - Unknown
2 - Positive Control
2 - Negative Control
24 - Empty
View Plate Layout
Arrange Plate By: Rows
Place Controls in: Upper Left
Show in Wells
View Legend
1 2 3 4 5 6 7 8
A
B
C
D
E
F
Sample 1
Sample 2
Sample 3
Sample 4
Sample 5
Sample 6
Sample 7
Sample 8
Sample 9

Einrichtungshinweise

Beachten Sie beim Einrichten Ihres eigenen Analysedesigns Folgendes:

- Verwenden Sie zwischen 1 und 48 Proben. Kennzeichnen Sie alle Proben mit eindeutigen Namen und Farben.
- Applied Biosystems empfiehlt, für jeden SNP-Assay mindestens eine Negativkontrolle zu verwenden.
- Beschränken Sie die Anzahl der Reaktionen insgesamt in jeder Analyse auf 48 oder weniger. Wenn die Anzahl der erforderlichen Gesamtreaktionen höher als 48 ist, beschränken Sie die Anzahl der SNP-Assays, Proben, Replikate oder Positiv- und Negativkontrollen, oder teilen Sie die Reaktionen auf zwei oder mehr Reaktionsplatten auf.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zum Bildschirm Samples & Replicates finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Hinweise

Definieren des Laufprofils

Im Bildschirm zum Definieren des Laufprofils können Sie das Reaktionsvolumen und das Standardlaufprofil überprüfen. Ändern Sie bei Bedarf Standardreaktionsvolumen und Laufprofil oder ersetzen Sie beides, indem Sie ein Laufprofil aus der Bibliothek installieren.

Informationen zur Beispielanalyse

In der Beispielanalyse werden 25-µl-Reaktionen mit der unten dargestellten TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay-Methode analysiert. Da das StepOne™-System zur Durchführung der Amplifikation verwendet wird, verfügt das Laufprofil über eine Cycling-Phase für die PCR.

	Prä-PCR-Messung	**PCR**			**Post-PCR-Messung**
Phase/Schritt	Haltephase	Haltephase	Cycling (50 Zyklen)		Haltephase
			Denaturieren	Anlagerung/ Extension	
Temperatur	60 °C	95 °C	92 °C	60 °C	60 °C
Zeit (hh:mm:ss)	00:00:30	00:10:00	00:00:15	00:01:00	00:00:30
Datenerfassung	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja

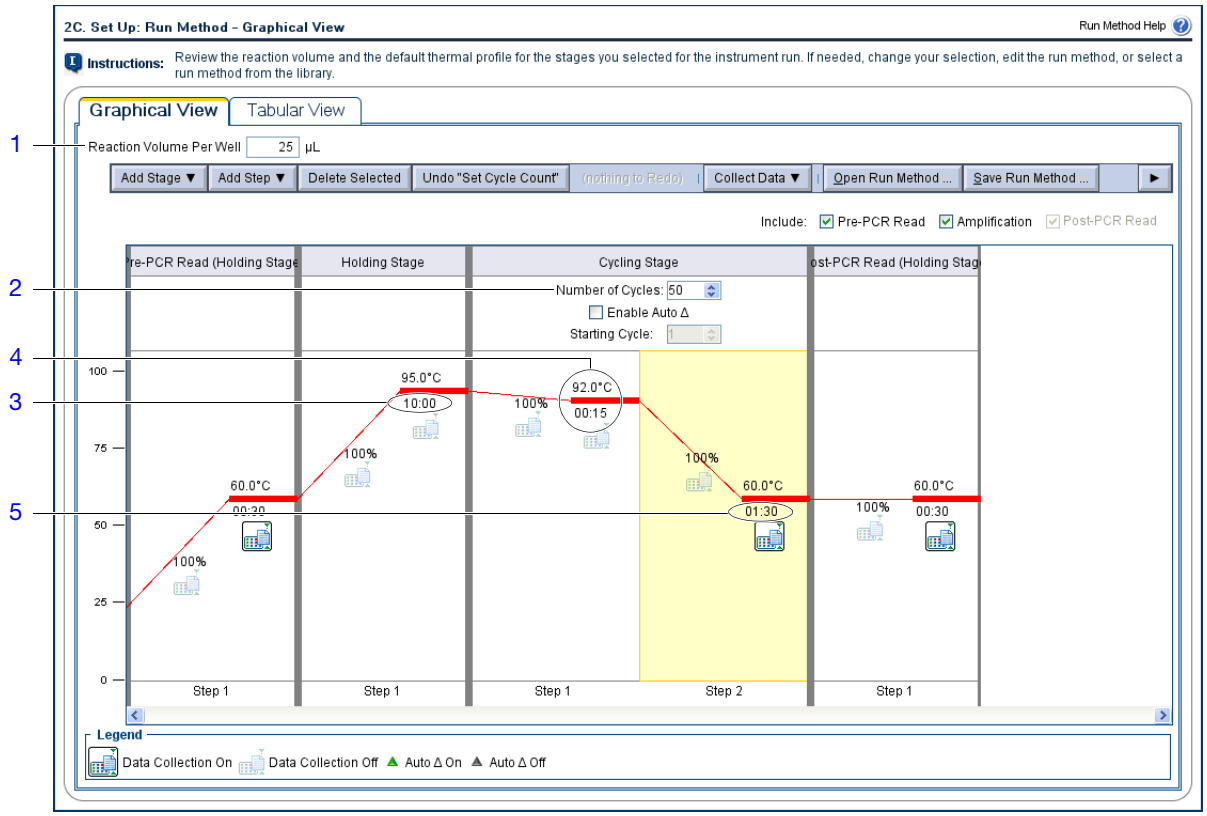
Hinweis: Bei der oben dargestellten Methode wird für den Schritt Anlagerung/Extension die Datenerfassung aktiviert, sodass das StepOne™-System während der PCR Daten in Echtzeit erfasst. Auch wenn die Echtzeitdaten für die Genotypisierung nicht erforderlich sind, können sie hilfreich bei der Fehlerbehebung fehlgeschlagener PCR-Läufe sein.

Laufprofil-Bildschirm überprüfen

1. Klicken Sie in das Feld **Reaction Volume Per Well** (Reaktionsvolumen pro Well), und geben Sie **25** ein.
2. Klicken Sie auf das Feld **Number of Cycles** (Anzahl der Zyklen), und geben Sie **50** ein.
3. Klicken Sie auf die Zeiteinstellung für den ersten Schritt der Cycling-Phase (95 °C/00:20), und geben Sie **10:00** ein.
4. Passen Sie den ersten Schritt der Cycling-Phase an:
   a. Klicken Sie auf die Temperatureinstellung für den ersten Schritt (95 °C) und geben Sie dann **92** °C ein.
   b. Klicken Sie auf die Zeiteinstellung für den ersten Schritt (92 °C), und geben Sie **00:15** ein.
5. Klicken Sie auf die Zeiteinstellung für den zweiten Schritt (60 °C) und geben Sie **01:30** ein.

Hinweise

6. Klicken Sie auf **Next >** (Weiter).



Einrichtungshinweise

Beachten Sie beim Einrichten Ihres eigenen Analysedesigns Folgendes:

- Geben Sie ein Reaktionsvolumen/Well von 10 bis 30 µl ein. Applied Biosystems empfiehlt für Genotypisierungsanalysen ein Reaktionsvolumen von 25 µl.
- Prüfen Sie das Standardlaufprofil. Falls Sie für Ihre Analyse andere Einstellungen benötigen, bearbeiten Sie das Standardlaufprofil nach Bedarf.
- Klicken Sie zur Anzeige einer Bibliothek von Laufprofilen auf **Open Run Method** (Laufprofil öffnen). Möglicherweise enthält die Bibliothek einen für Ihre Analyse geeignetes Laufprofil.
- Überlegen Sie sich, ob Sie eventuell die Amplifikation in das Laufprofil einbeziehen möchten. Echtzeitdaten können zur Behebung bei fehlerhaften Genotypisierungsanalysen hilfreich sein.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zum Laufprofilbildschirm finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Hinweise

Überprüfen des Pipettierprotokolls

Im Einrichtungsbildschirm Set Up Reaction können Sie das Reaktionsvolumen sowie das überschüssige Reaktionsvolumen eingeben und anschließend die Konzentrationseinstellungen für den PCR-Mastermix, den Assay-Mix, die verdünnte Proben-Zielsequenz und die Proben-Stammlösungen überprüfen und die notwendigen Änderungen vornehmen.

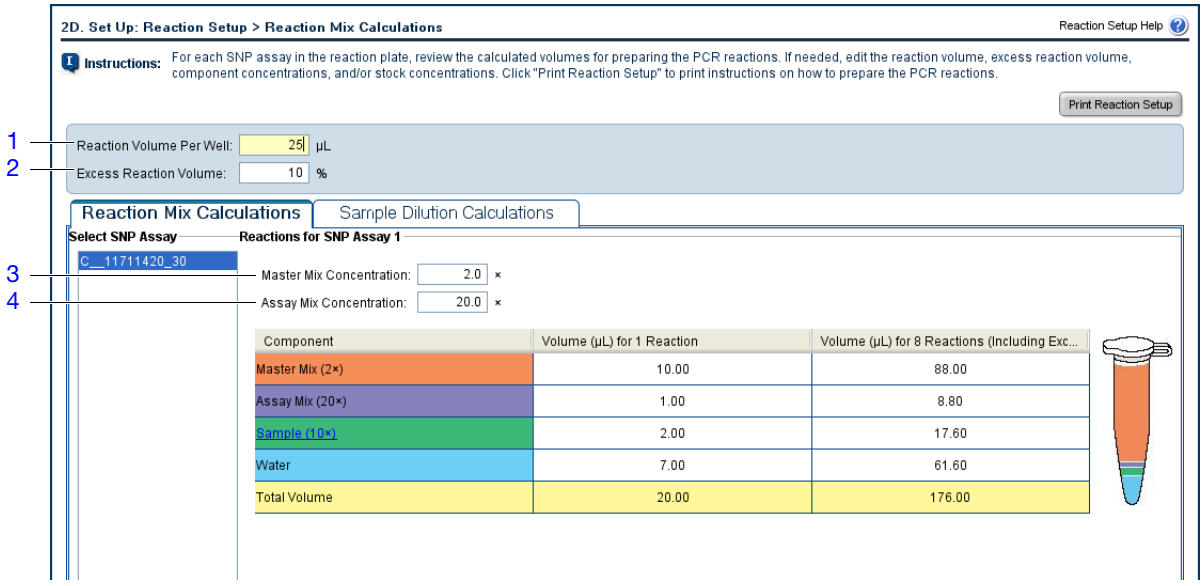
Informationen zur Beispielanalyse

Die Beispielanalyse erfordert Reaktionsmix für 24 Reaktionen und 10 % zur Pipettierfehlerkompensation. Jede 25-µl-Reaktion besteht aus:

Komponente	µl/Well
2× TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	12,50
20× TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay	1,25
Genomisches DNA-Template (3 bis 20 ng) + DNAse-freies Wasser	11,25
Gesamtvolumen	25,00

Pipettierprotokoll-einrichtungs-bildschirm vervollständigen

1. Klicken Sie in das Feld **Reaction Volume Per Well** (Reaktionsvolumen pro Well), und geben Sie **25** µl ein.
2. Klicken Sie auf das Feld Excess Reaction Volume (Überschüssiges Reaktionsvolumen) und geben Sie **10 %** ein.
3. Bestätigen Sie die Mastermix-Konzentration (**2**×).
4. Bestätigen Sie die TaqMan® Assay-Mix -Konzentration (**20**×).


2D. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations
Reaction Setup Help
Instructions: For each SNP assay in the reaction plate, review the calculated volumes for preparing the PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.
Print Reaction Setup
1
Reaction Volume Per Well: 25 µL
2
Excess Reaction Volume: 10 %
Reaction Mix Calculations
Sample Dilution Calculations
Select SNP Assay
Reactions for SNP Assay 1
C__11711420_30
3
Master Mix Concentration: 2.0 ×
4
Assay Mix Concentration: 20.0 ×
Component
Volume (µL) for 1 Reaction
Volume (µL) for 8 Reactions (Including Exc...
Master Mix (2×) 10.00 88.00
Assay Mix (20×) 1.00 8.80
Sample (10×) 2.00 17.60
Water 7.00 61.60
Total Volume 20.00 176.00

Hinweise

5. Wählen Sie den Reiter **Sample Dilutions Calculations** (Berechnung der Probenverdünnungen) aus.

6. Klicken Sie in das Feld **Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix)** (Konzentration der verdünnten Probe (10fach für Reaktionsmix)), und geben Sie dann **30** ng/µl ein.

7. Bestätigen Sie, dass die Stammkonzentration aller Proben **100ng/µl** beträgt.

8. Drucken Sie zur Referenz einen Bericht der Plattenbelegung aus:

   a. Klicken Sie auf **Print Reaction Setup** (Pipettierprotokoll drucken).

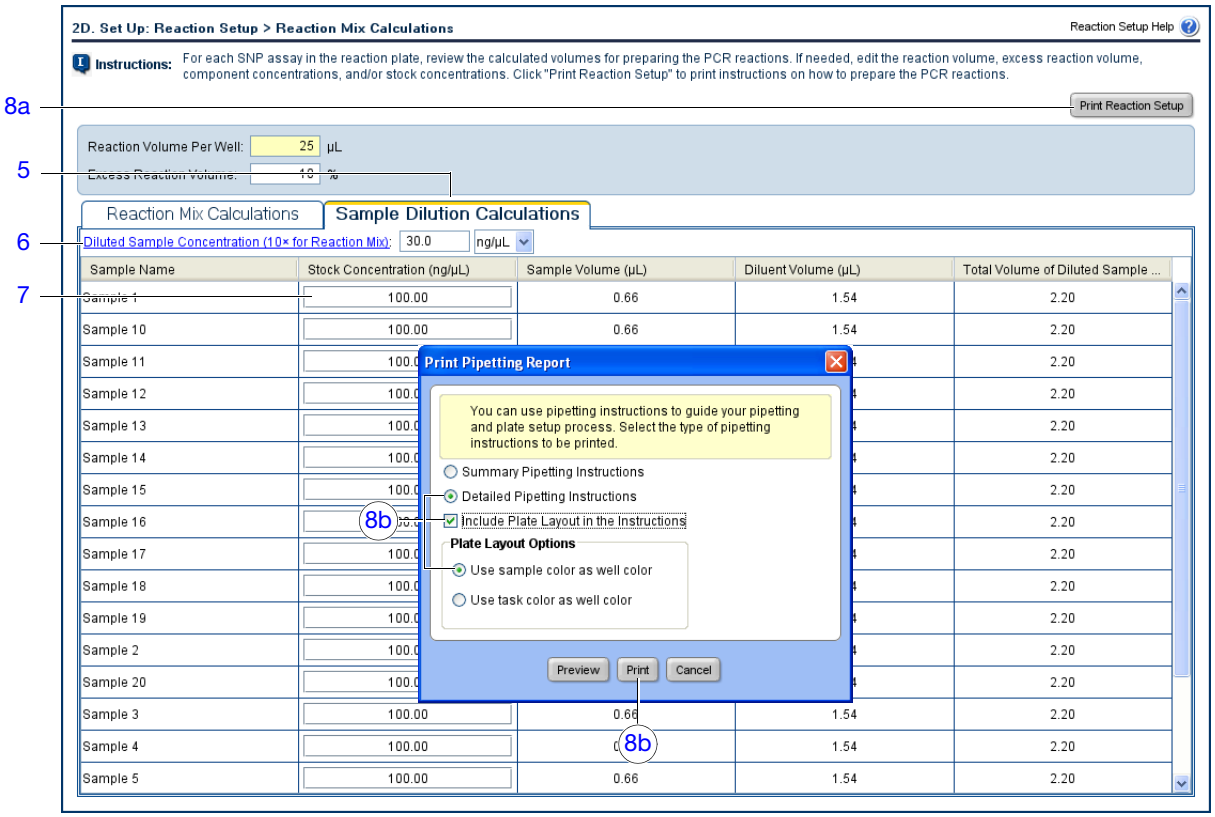
   b. Wählen Sie im Dialogfeld Folgendes aus:

      - **Detailed Pipetting Instructions (Detaillierte Pipettieranweisungen)**
      - **Include Plate Layout in the Instructions (Plattenbelegung in Anweisungen integrieren)**
      - **Use sample color as well color (Probenfarbe als Well-Farbe verwenden)**

   c. Klicken Sie auf **Print** (Drucken).

   d. Wählen Sie im Dialogfeld Print (Drucken) den Drucker und die Druckoptionen aus, und klicken Sie dann auf **OK**.

9. Klicken Sie auf **Next >** (Weiter).


2D. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations
Reaction Setup Help
Instructions:
For each SNP assay in the reaction plate, review the calculated volumes for preparing the PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.
8a
Print Reaction Setup
Reaction Volume Per Well: 25 µL
5
Reaction Mix Calculations
Sample Dilution Calculations
6
Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix): 30.0 ng/µL
7
Sample Name
Stock Concentration (ng/µL)
Sample Volume (µL)
Diluent Volume (µL)
Total Volume of Diluted Sample ...
Sample 10 100.00 0.66 1.54 2.20
Sample 11 100.00 2.20
Sample 12 100.00 2.20
Sample 13 100.00 2.20
Sample 14 100.00 2.20
Sample 15 100.00 2.20
Sample 16 2.20
Sample 17 100.00 2.20
Sample 18 100.00 2.20
Sample 19 100.00 2.20
Sample 2 100.00 2.20
Sample 20 100.00 2.20
Sample 3 100.00 0.66 1.54 2.20
Sample 4 100.00 1.54 2.20
Sample 5 100.00 0.66 1.54 2.20
Print Pipetting Report
You can use pipetting instructions to guide your pipetting and plate setup process. Select the type of pipetting instructions to be printed.
Summary Pipetting Instructions
Detailed Pipetting Instructions
8b
Include Plate Layout in the Instructions
Plate Layout Options
Use sample color as well color
Use task color as well color
Preview
Print
Cancel
8b

Hinweise

Einrichtungshinweise

Beachten Sie beim Einrichten Ihres eigenen Analysedesigns Folgendes:

- Geben Sie ein Reaktionsvolumen/Well von 10 bis 30 µl ein. Applied Biosystems empfiehlt für Genotypisierungsanalysen ein Reaktionsvolumen von 25 µl.
- Geben Sie ein überschüssiges Reaktionsvolumen von mindestens 10 % ein, damit Pipettier- oder sonstige Analysefehler berücksichtigt werden.
- Wenn Sie ein getrocknetes DNA-Template verwenden, werden die Komponenten und Volumina neu berechnet.

Weitere Informationen

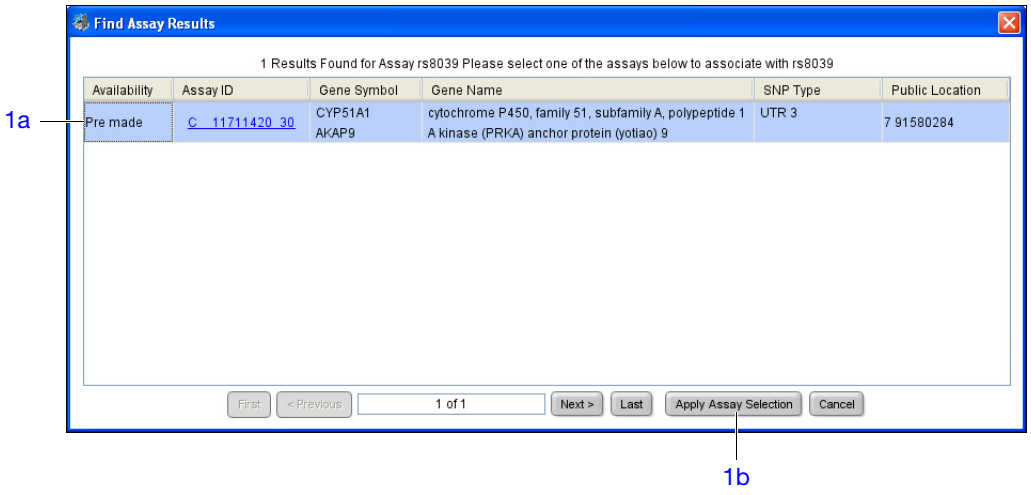
Weitere Informationen zum Bildschirm Reaction Setup finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Bestellen von Materialien für die Analyse

Prüfen Sie die auf dem Bildschirm Order Materials List zur Vorbereitung der Reaktionsplatte aufgeführte Materialliste und fügen Sie die Artikel hinzu, die Sie bestellen möchten. Geben Sie anschließend die Bestellung auf.

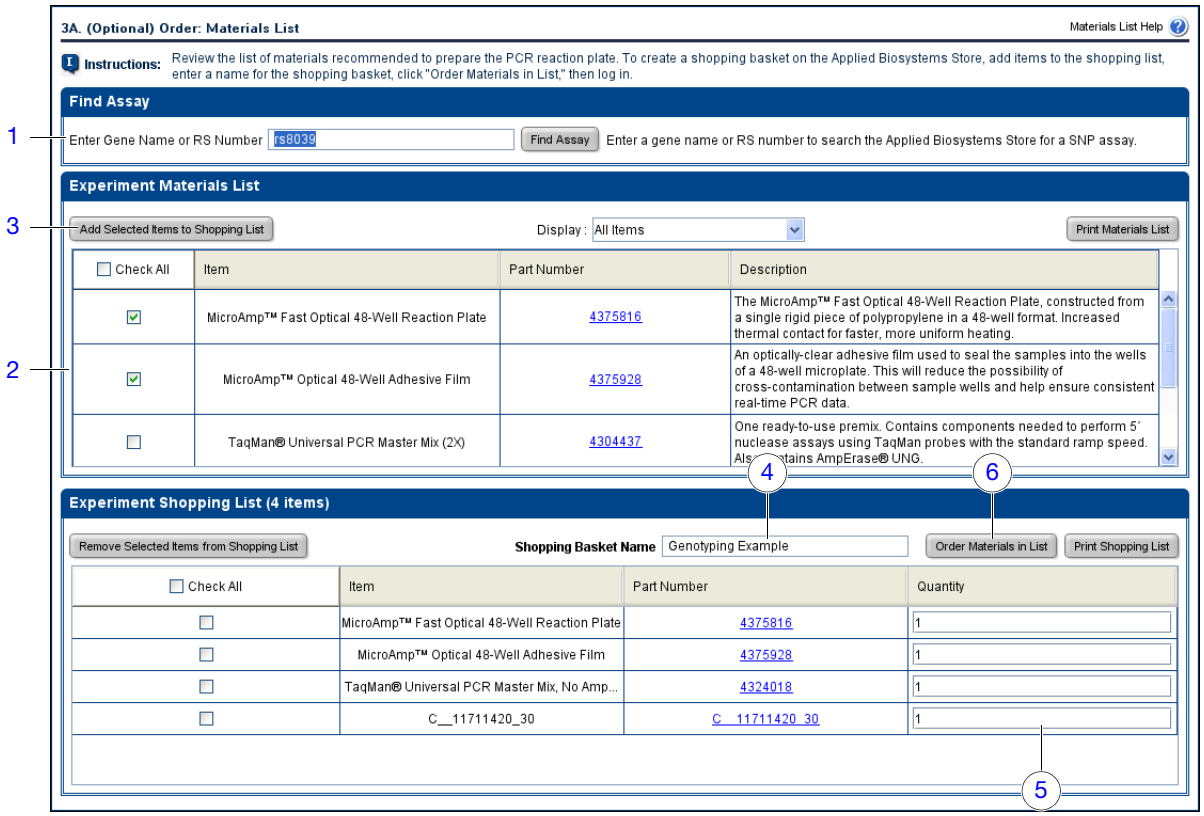
Bildschirm Materialbestellung vervollständigen

1. Klicken Sie auf das Feld Gene Name (Name des Gens) oder RS Number (RS-Nummer), geben Sie **rs8039** ein, und klicken Sie anschließend auf **Find Assay** (Assay suchen), um den entsprechenden Assay von der Applied Biosystems-Website zu erhalten:
   a. Wählen Sie im Dialogfeld Find Assay Results (Ergebnisse der Assay-Suche) den Assay **C__11711420_30**.
   b. Klicken Sie auf **Apply Assay Selection** (Assay-Auswahl anwenden).



Hinweise

2. Füllen Sie den Bereich Experiment Materials List (Liste der Analysematerialien) aus:
   - **C__11711420_30**
   - **MicroAmp Optical 48-Well Adhesive Film**
   - **MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates**
   - **TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG**
3. Klicken Sie auf **Add Selected Items to Shopping List** (Ausgewählte Artikel zur Einkaufsliste hinzufügen).
4. Klicken Sie in das Feld **Shopping Basket Name** (Name des Warenkorbs), geben Sie dann **Example Experiment** (Beispielanalyse) ein.
5. Prüfen Sie, dass in der Einkaufsliste alle gewünschten Materialien in der jeweils richtigen Menge aufgeführt sind.
6. Klicken Sie auf **Order Materials in List** (Materialien der Liste bestellen).
7. Geben Sie Ihre Anmeldedaten für den Applied Biosystems Store ein und klicken Sie auf **Login and Submit** (Anmelden und Abschicken) oder klicken Sie auf **Register Now** (Jetzt registrieren), und befolgen Sie die Anweisungen zur Registrierung.
8. Nachdem Sie Ihre Bestellung aufgegeben haben, klicken Sie auf **Finish Designing Experiment** (Einrichtung des Analysedesigns fertigstellen).


3A. (Optional) Order: Materials List
Materials List Help
Instructions: Review the list of materials recommended to prepare the PCR reaction plate. To create a shopping basket on the Applied Biosystems Store, add items to the shopping list, enter a name for the shopping basket, click "Order Materials in List," then log in.
Find Assay
1
Enter Gene Name or RS Number
rs8039
Find Assay
Enter a gene name or RS number to search the Applied Biosystems Store for a SNP assay.
Experiment Materials List
3
Add Selected Items to Shopping List
Display : All Items
Print Materials List
Check All
Item
Part Number
Description
2
MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
4375816
The MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate, constructed from a single rigid piece of polypropylene in a 48-well format. Increased thermal contact for faster, more uniform heating.
MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
4375928
An optically-clear adhesive film used to seal the samples into the wells of a 48-well microplate. This will reduce the possibility of cross-contamination between sample wells and help ensure consistent real-time PCR data.
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)
4304437
One ready-to-use premix. Contains components needed to perform 5′ nuclease assays using TaqMan probes with the standard ramp speed.
4
6
Experiment Shopping List (4 items)
Remove Selected Items from Shopping List
Shopping Basket Name
Genotyping Example
Order Materials in List
Print Shopping List
Check All
Item
Part Number
Quantity
MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
4375816
1
MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
4375928
1
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No Amp...
4324018
1
C__11711420_30
C__11711420_30
1
5

Hinweise

Einrichtungshinweise

Beachten Sie beim Einrichten Ihres eigenen Analysedesigns Folgendes:

- Stellen Sie sicher, dass Ihr Computer über eine uneingeschränkte Internetverbindung verfügt.
- Wählen Sie alle Materialien aus, die Sie für Ihre Analyse benötigen, und fügen Sie sie zu Ihrer Einkaufsliste hinzu.

WICHTIG! Das StepOne™-System läuft nur mit Fast-Verbrauchsmaterialien (Reaktionsplatten, Reaktionsgefäßstreifen und Reaktionsgefäß). Wenn Sie eine Genotypisierungsanalyse durchführen, setzen Sie die Reaktionen mit Standard-TaqMan® Universal PCR Master Mix in Fast-Verbrauchsmaterialien und unter Standard-PCR-Bedingungen an.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zum Vervollständigen des Bildschirms Materials List finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

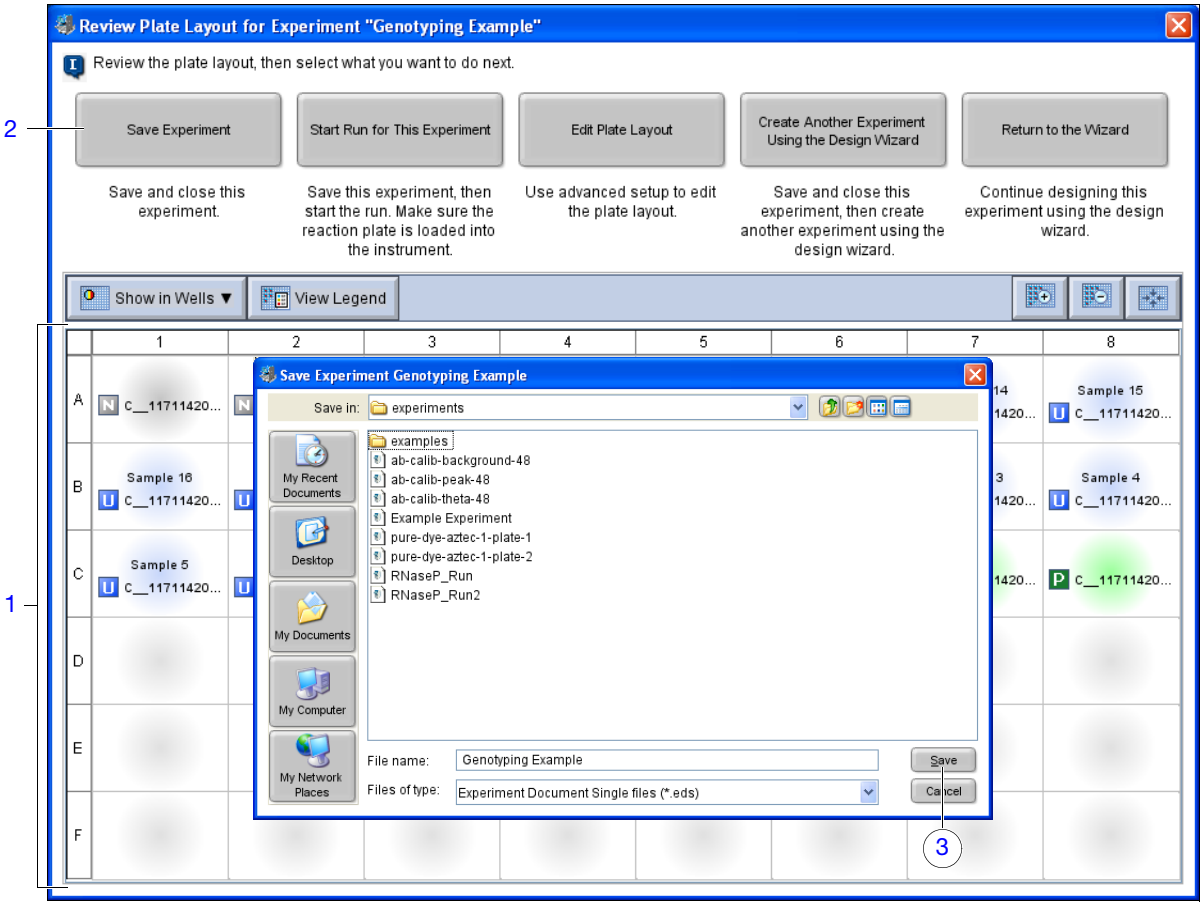
Hinweise

Beenden des Analysedesign-Assistenten

Wählen Sie im Dialogfeld Review Plate Layout for Experiment (Prüfen der Plattenbelegung für die Analyse) eine Option zum Beenden des Analysedesign-Assistenten, zur Prüfung der Plattenbelegung und zum Starten des Laufs.

Analysedesign-Assistenten beenden

1. Prüfen Sie die Plattenbelegung. Sollte die Plattenbelegung fehlerhaft sein, klicken Sie auf **Return to the Wizard** (Zurück zum Assistenten), und überprüfen Sie die eingegebenen Werte.
2. Wählen Sie **Save Experiment** (Analyse speichern).
3. Klicken Sie im Dialogfeld Save Experiment (Analyse speichern) auf **Save** (Speichern), um die Analyse als Genotyping Example.eds zu speichern.



Hinweise

Einrichtungshinweise

Wenn Sie eine eigene Analyse erstellen, wird Ihre Analyse unter

<*drive (Laufwerk)*>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments gespeichert,

wobei <*drive (Laufwerk)*> das Installationsverzeichnis der StepOne™-Software ist.

Hinweis: Zum Ändern des Standardordners wählen Sie **Tools ▸ Preferences** (Einstellungen), ändern den Default Data Folder auf den gewünschten Speicherort und klicken auf **OK**.

Hinweise

Hinweise

3 Ansetzen der Reaktionen

Dieses Kapitel umfasst die folgenden Themen:

- Kapitelübersicht 36
- Ansetzen der Probenverdünnungen 37
- Ansetzen des Reaktionsmix 38
- Vorbereiten der Reaktionsplatte 40

Hinweis: Weitere Informationen über ein Thema dieses Handbuchs finden Sie in der Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software, indem Sie entweder **F1** drücken, in der Symbolleiste auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

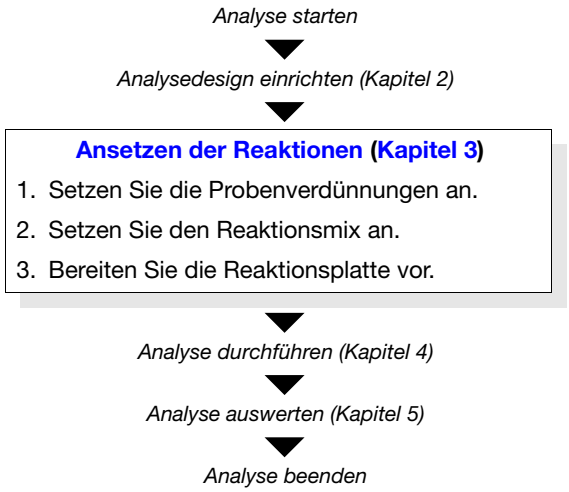
Hinweise

Kapitelübersicht

Dieses Kapitel erklärt, wie Sie die PCR-Reaktionen für die Beispiel-Genotypisierungsanalyse ansetzen und bietet Hinweise für das Ansetzen von PCR-Reaktionen für Ihre eigene Analyse.

Arbeitsablauf

Bereiten Sie die PCR-Reaktionen nach dem folgenden Arbeitsablauf vor:


Analyse starten
Analysedesign einrichten (Kapitel 2)
Ansetzen der Reaktionen (Kapitel 3)
1. Setzen Sie die Probenverdünnungen an.
2. Setzen Sie den Reaktionsmix an.
3. Bereiten Sie die Reaktionsplatte vor.
Analyse durchführen (Kapitel 4)
Analyse auswerten (Kapitel 5)
Analyse beenden

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Vorbereitung des TaqMan® SNP Genotyping Assays, siehe:

- *Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol* (BN 4334431)
- *Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol* (BN 4367671B)
- *TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol* (BN 4332856C)
- *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol* (BN 4362038A)
- *Performing a Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card* (BN 4371394A)
- *Performing a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card* (BN 4367636A)
- *Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol* (BN 4312214C)
- *Allelic Discrimination Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Quick Reference Card* (BN 4312212C)

Hinweis: Die in diesem Kapitel beschriebenen Verfahren konzentrieren sich auf die Verwendung flüssiger DNA-Proben. Wenn Sie mit getrockneter DNA arbeiten, richten Sie sich bezüglich der Einzelheiten zu Rekonstituierung und Plattenbelegung Ihrer Proben nach dem Reagenzienprotokoll ihres PCR-Kits.

Hinweise

Ansetzen der Probenverdünnungen

Verdünnen Sie die Probenstammlösung so, dass Sie die Konzentrationen zu den von der StepOne™-Software (siehe „Überprüfen des Pipettierprotokolls“ auf Seite 27) berechneten Volumina erhalten.

Informationen zur Beispielanalyse

Die berechneten Volumina für die Genotypisierungsanalyse sind unten aufgeführt. Die endgültige Konzentration beträgt 30,0 ng/µl.

Reaktions-gefäß	Proben-name	Konzentration der Proben-lösung (ng/µl)	Volumen (µl)		
			Proben-stamm (µl)	DNAse-freies Wasser (µl)	Verdünnte Proben-lösung insgesamt (µl)
1	Probe 1	100,0	0,66	1,54	2,20
2	Sample 2	100,0	0,66	1,54	2,20
…	…	…	…	…	…
21	Probe 21	100,0	0,66	1,54	2,20

Benötigte Materialien

- DNAse-freies Wasser zur Probenverdünnung
- Mikrozentrifugen-Röhrchen
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Probenstammlösung
- Vortexer
- Zentrifuge

Proben vorbereiten

1. Beschriften Sie für jede Probe ein separates Mikrozentrifugen-Reaktionsgefäß: **Probe 1**, **Probe 2**,… bis **Probe 20**.
2. Geben Sie 1,54 µl DNAse-freies Wasser in jedes leere Reaktionsgefäß.
3. Geben Sie 0,66 µl der jeweiligen Probenstammlösung zu jedem Reaktionsgefäß.
4. Vortexen Sie jede verdünnte Probe 3 bis 5 Sekunden, und zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße.

Vorbereitungs-hinweise

Bei der Vorbereitung von Proben für Ihre eigenen Analysen ist Folgendes zu beachten:

- Verwenden Sie DNAse-freies Wasser zur Probenverdünnung.
- Nehmen Sie für jede Analyse dieselbe Menge DNA pro Well.
- Erhitzen Sie die DNA-Proben nicht.

Weitere Informationen

Weitere Informationen über das Vorbereiten von TaqMan®-SNP-Genotypisierungs-Assays finden Sie in den jeweiligen Protokollen der Reagenzien, die Sie bei den PCR-Reaktionen verwenden (siehe „Weitere Informationen“ auf Seite 36).

Hinweise

Ansetzen des Reaktionsmix

Setzen Sie den Reaktionsmix für die Analyse anhand der Volumina an, die von der StepOne™-Software errechnet werden. Die StepOne™-Software bestimmt die zu verwendenden Reaktionsmixkomponenten anhand der in Bildschirm Methods and Materials gemachten Angaben (siehe „Überprüfen des Pipettierprotokolls“ auf Seite 27). Für Genotypisierungsanalysen enthält der Reaktionsmix alle Komponenten *außer* der Probe, des Puffers und der Positivkontrolle.

Benötigte Materialien

- TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X)
- TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay (20X)
- DNAse-freies Wasser
- Mikrozentrifugen-Röhrchen
- Pipetten
- Pipettenspitzen
- Zentrifuge

Reaktionsmix ansetzen

VORSICHT CHEMISCHE GEFAHREN TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG kann Augen- und Hautreizungen hervorrufen. Durch Schlucken oder Einatmen können Beschwerden verursacht werden. Lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt, und befolgen Sie die Handhabungsanweisungen. Tragen Sie eine geeignete Schutzbrille sowie Schutzkleidung und -handschuhe.

1. Geben Sie für den SNP-Assay die erforderlichen Volumina von jeder Komponente in ein Reaktionsgefäß von entsprechender Größe:

Komponente	Reaktionsvolumen			
	Pro Well (µl)		24 Rxns. einschl. 10% Überschuss (µl)	
	Getrocknet	Flüssig	Getrocknet	Flüssig
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2-fach)	12,50	12,50	330	330
SNP Assay Mix (20-fach)	1,25	1,25	33	33
H_2O, DNAse-frei	11,25	0	297	0
Gesamtvolumen des Reaktionsmixes	**25,00**	**13,75**	**660**	**363**

2. Pipettieren Sie den Reaktionsmix vorsichtig von oben nach unten und verschließen Sie dann das Reaktionsgefäßchen.
3. Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz.

Hinweise

Vorbereitungshinweise

Wenn Sie einen Reaktionsmix für Ihre eigene Analyse ansetzen, achten Sie darauf, dass folgende Bedingungen erfüllt sind:

- Die Reaktionen für jeden SNP werden separat vorbereitet.
- Berücksichtigen Sie bei Ihren Berechnungen Überschussvolumen, mit dem Sie die beim Transfer von Reagenzien auftretenden Verluste kompensieren können.
- Verwenden Sie alle erforderlichen Komponenten.
- Setzen Sie die Reagenzien entsprechend der Herstelleranweisungen an.
- Schützen Sie den Assay-Mix bis zu seiner Verwendung im Gefriergerät vor Licht. Übermäßige Lichteinstrahlung kann die Funktion der Fluoreszenzsonden beeinträchtigen.

Führen Sie vor der Ausführung folgende Schritte durch:

- Schütteln Sie die Flasche, um den Master-Mix gründlich zu mischen.
- Resuspendieren Sie den Assay erneut durch Vortexen, und zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz.
- Legen Sie alle gefrorenen Proben auf Eis, um sie aufzutauen. Wenn sie aufgetaut sind, resuspendieren Sie die Proben erneut durch Vortexen, und zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße kurz.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Vorbereitung des Reaktionsmixes finden Sie in den jeweiligen Protokollen der Reagenzien, die Sie bei den PCR-Reaktionen verwenden (siehe „Weitere Informationen“ auf Seite 36).

Hinweise

Vorbereiten der Reaktionsplatte

Füllen Sie die Reaktionsplatte mit dem Reaktionsmix von Seite 38 und den verdünnten Proben von Seite 37. Die Reaktionen werden nach der von der StepOne™-Software generierten Plattenbelegung zugegeben (siehe „Definieren der Proben und Replikate“ auf Seite 23).

Benötigte Materialien

- Zentrifuge
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp Optical 48-Well Adhesive Film
- Pipette und Pipettenspitzen

Hinweis: Das StepOne™-System läuft nur mit MicroAmp™ Fast-Verbrauchsmaterialien.

Reaktionsplatte vorbereiten: Getrocknete DNA

1. Pipettieren Sie 1 µl der geeigneten Probe (3 bis 20 ng der gereinigten genomischen DNA) in jeden einzelnen Well der Optical 48-Well-Reaktionsplatte.

   Alle Wells desselben Genotypisierungs-Assays müssen dieselbe Menge an Probe bzw. Kontrolle enthalten.

2. Trocknen Sie die Proben durch Verdunstung bei Raumtemperatur an einem dunklen, Amplikon-freien Ort. (Decken Sie die Reaktionsplatte beim Trocknen mit einem fusselfreien Tuch ab).

3. Übertragen Sie 25 µl des Reaktionsmixes in jeden Well.

   WICHTIG! Stellen Sie sicher, dass von Well zu Well keine Kreuzkontamination möglich ist.

4. Versiegeln Sie die Reaktionsplatte mit optischem Klebefilm.

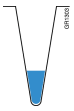
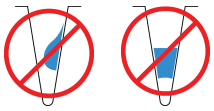
5. Vortexen Sie die Reaktionsplatte für 3 bis 5 Sek.

6. Zentrifugieren Sie die Reaktionsplatte kurz.

7. Stellen Sie sicher, dass sich die Flüssigkeit in allen Wells der Reaktionsplatte auf dem Boden befindet. Wenn dies nicht der Fall ist, zentrifugieren Sie die Platte noch einmal mit höherer Geschwindigkeit und für längere Zeit.

   WICHTIG! Achten Sie darauf, dass der Boden der Reaktionsplatte nicht schmutzig wird. Flüssigkeiten und andere Kontaminanten, die am Boden der Reaktionsplatte haften bleiben, können den Heizblock kontaminieren und ein ungewöhnlich hohes Hintergrundsignal verursachen.

Hinweise

Richtig	Falsch
 Flüssigkeit am Boden des Wells	 • nicht kräftig genug *oder* • nicht lange genug zentrifugiert

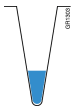
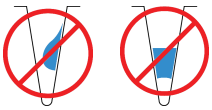
Reaktionsplatte vorbereiten: Flüssige gDNA

1. Verdünnen Sie alle gereinigten genomischen DNA-Proben mit DNAse-freiem Wasser, so dass eine endgültige DNA-Masse im Bereich 3 bis 20 ng pro Reaktions-Well entsteht. Das Volumen von DNA-Probe und DNAse-freiem Wasser pro Reaktion sollte 11,25 µl betragen.
2. Pipettieren Sie in jeden Well der Reaktionsplatte ein Kontroll- oder Probenaliquot des für den Reaktionsplattentyp geeigneten Volumens (siehe Schritt 1):
   a. Geben Sie für jede unbekannte Reaktion 11,25 µl der Probe in die entsprechenden Wells.
   b. Geben Sie für jede Negativkontrollreaktion 11,25 µl DNAse-freies Wasser in die entsprechenden Wells.
   c. Geben Sie für jede Positivkontrollreaktion 11,25 µl der Positivkontrolle in die entsprechenden Wells.

   WICHTIG! Achten Sie darauf, dass der Genotyp des Positivkontroll-Templates dem Genotyp entspricht, der dem Well zugeordnet ist.
3. Übertragen Sie 13,75 µl des Reaktionsmixes in die jeweiligen Wells.
4. Versiegeln Sie die Reaktionsplatte mit optischem Klebefilm.
5. Vortexen Sie die Reaktionsplatte für 3 bis 5 Sek. und zentrifugieren Sie sie anschließend kurz.
6. Zentrifugieren Sie die Reaktionsplatte kurz.

   WICHTIG! Achten Sie darauf, dass der Boden der Reaktionsplatte nicht schmutzig wird. Flüssigkeiten und andere Kontaminanten, die am Boden der Reaktionsplatte haften bleiben, können den Heizblock kontaminieren und ein ungewöhnlich hohes Hintergrundsignal verursachen.

Hinweise

Richtig	Falsch
 Flüssigkeit am Boden des Wells	 • nicht kräftig genug *oder* • nicht lange genug zentrifugiert

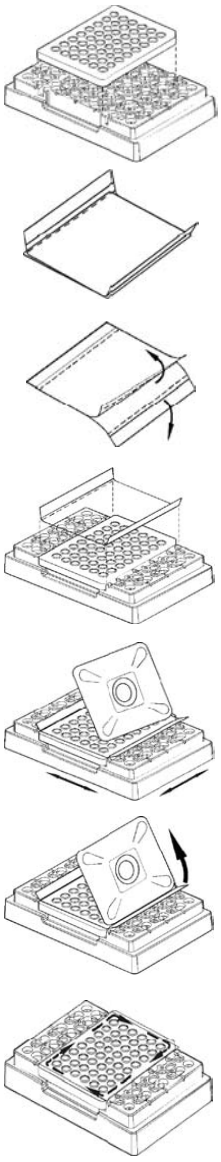
Vorbereitungshinweise

Bei der Vorbereitung der Reaktionsplatte für Ihre eigenen Analysen ist Folgendes zu beachten:

- Stellen Sie sicher, dass Sie die richtigen Verbrauchsmaterialien verwenden.
- Stellen Sie sicher, dass die Plattenbelegung in der Reaktionsplatte sowie der StepOne™-Software überein stimmt.
- Falls Sie weniger als 40 Reaktionen laufen lassen, verwenden Sie lieber Reaktionsgefäßstreifen als eine Reaktionsplatte.
- Laden Sie 3 bis 20 ng gereinigte genomische DNA pro Reaktion.
- Alle Wells desselben Genotypisierungs-Assays müssen dieselbe Menge an Probe bzw. Kontrolle enthalten.
- Sie können auch mehrere Assays auf einer Reaktionsplatte laufen lassen, sie müssen jedoch separat analysiert werden.

Hinweise

- Wenn Sie für die Versiegelung der Platten optischen Klebefilm verwenden, versiegeln Sie jede Platte wie folgt:

Assay	Beispiel
1. Legen Sie die Optical-48-Well-Reaktionsplatte in die Mitte der 96-Well-Spritzfreien Auflage. Stellen Sie sicher, dass die Platte mit der Oberfläche der Auflage abschließt. 2. Befüllen Sie die Optical 48-Well-Reaktionsplatte wie gewünscht. 3. Entnehmen Sei einen einzelnen optischen Klebefilm aus der Box. Biegen Sie beide Seitenlaschen nach oben. Halten Sie die Rückseite des Klebefilms nach oben. 4. Ziehen Sie in einer fließenden Bewegung die schützende Rückseite des Klebefilms von der mittleren Versiegelungsoberfläche ab. Berühren Sie nicht die Mitte der Versiegelungsoberfläche. 5. Halten Sie den optischen Klebefilm an den Endlaschen, senken Sie den optischen Film auf die 48-Well-Reaktionsplatte (Klebeseite der Platte zugewandt). Vergewissern Sie sich, dass der Film alle Wells der Platte vollständig zudeckt. 6. Bewegen Sie den Applikator langsam über den optischen Klebefilm und drücken Sie dabei waagerecht und senkrecht fest an, um einen guten Kontakt zwischen Film und Platte über die gesamten Oberfläche der Reaktionsplatte zu gewährleisten. 7. Während Sie mit dem Applikator den Rand des Films festhalten, nehmen Sie das eine Ende der Endlaschen und ziehen Sie es rasch nach oben ab. Wiederholen Sie diesen Vorgang bei der anderen Lasche. 8. Wiederholen Sie Schritt 7. Bewegen Sie den Applikator waagerecht und senkrecht mit festem Druck über den optischen Klebefilm, um eine dichte, verdunstungssichere Versiegelung zu gewährleisten. 9. Um eine dichte Versiegelung sicherzustellen, drücken Sie den Applikator nochmals fest entlang aller vier Seiten des Außenrandes des optischen Klebefilms. Überprüfen Sie die Platte um sicherzustellen, dass alle Wells versiegelt sind (prüfen Sie, ob von allen Wells ein Abdruck auf der Oberfläche des optischen Klebefilms zu erkennen ist). **WICHTIG!** Ein unsauberes Abziehen des Films kann zu Beschlagen der Wells führen, hat jedoch keine Auswirkungen auf die Testergebnisse. Der Beschlag verschwindet, sobald der Film mit dem Heizdeckel des Geräts in Kontakt kommt. **Hinweis:** Optische Klebefilme bleiben bei Kontakt nicht haften. Der Klebefilm muss angedrückt werden, damit eine dichte, verdunstungssichere Versiegelung sichergestellt ist.	

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Vorbereitung derReaktionsplatte finden Sie in den jeweiligen Protokollen der Reagenzien, die Sie bei den PCR-Reaktionen verwenden (siehe „Weitere Informationen“ auf Seite 36).

Hinweise

Hinweise

4 Analysedurchführung

Dieses Kapitel umfasst die folgenden Themen:

- Kapitelübersicht 46
- Vorbereiten des Laufs 47
- Aktivieren der Benachrichtigungen (optional) 49
- Starten der Analyse 51
- Überwachen der Analyse 55
- Entnehmen der Reaktionsplatte und Übertragen der Daten 66

Hinweis: Weitere Informationen über ein Thema dieses Handbuchs finden Sie in der Applied Biosystems StepOne™-Real-Time PCR System Software, indem Sie entweder **F1** drücken, in der Symbolleiste auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

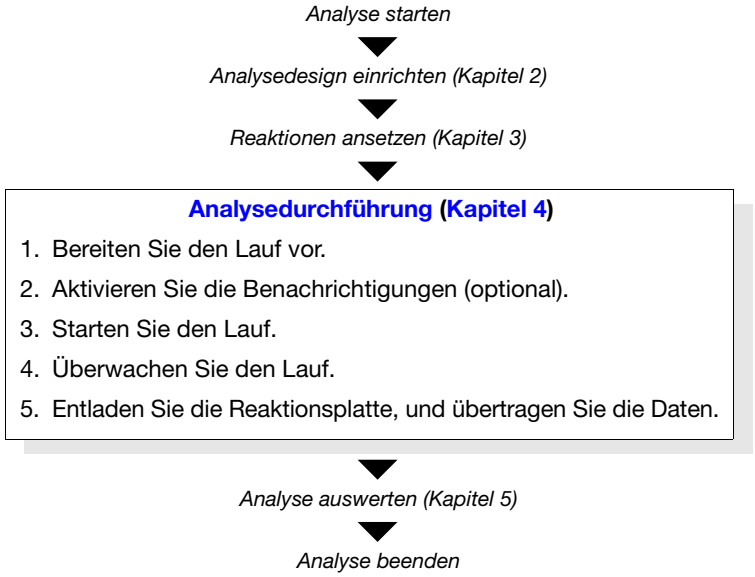
Hinweise

Kapitelübersicht

Dieses Kapitel erklärt, wie Sie eine Analyse auf dem Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System durchführen.

Arbeitsablauf

Führen Sie die Analyse nach dem folgenden Arbeitsablauf durch:


Analyse starten
Analysedesign einrichten (Kapitel 2)
Reaktionen ansetzen (Kapitel 3)
Analysedurchführung (Kapitel 4)
1. Bereiten Sie den Lauf vor.
2. Aktivieren Sie die Benachrichtigungen (optional).
3. Starten Sie den Lauf.
4. Überwachen Sie den Lauf.
5. Entladen Sie die Reaktionsplatte, und übertragen Sie die Daten.
Analyse auswerten (Kapitel 5)
Analyse beenden

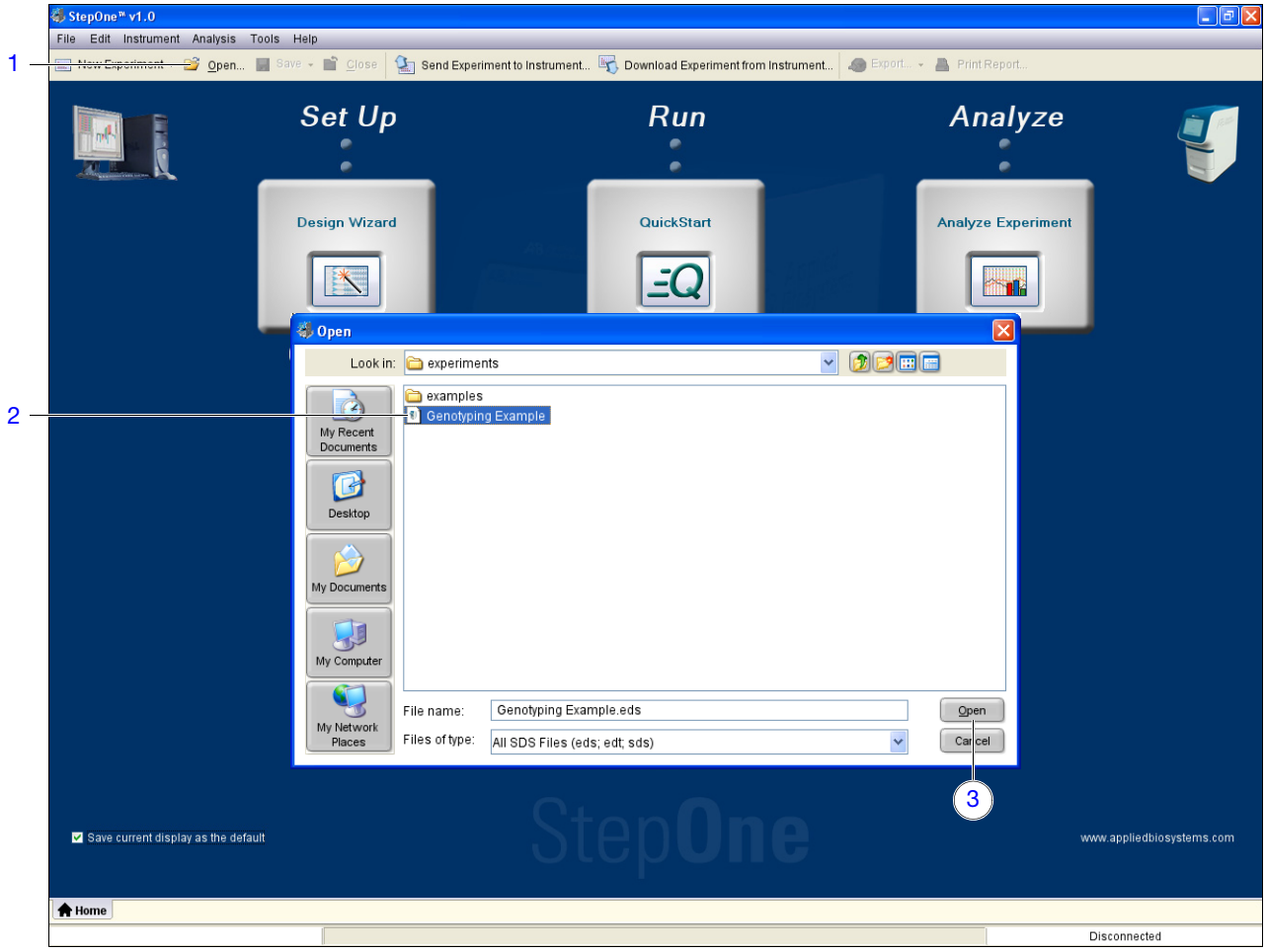
Hinweise

Vorbereiten des Laufs

Bereiten Sie den Lauf vor, indem Sie die Analyse öffnen und die versiegelte MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate in das StepOne™-System einlegen.

Analyse öffnen

1. Klicken Sie in der StepOne™-Software auf **Open** (Öffnen).
2. Wählen Sie **Genotyping Example.eds**.
3. Klicken Sie auf **Open** (Öffnen).



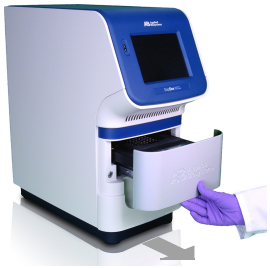
Hinweise

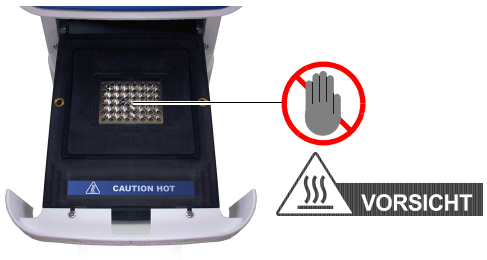
Einlegen der Reaktionsplatte

VORSICHT **VERLETZUNGSGEFAHR** Beim Betrieb des Geräts kann die Temperatur des Heizblocks auf über 100 °C ansteigen. Wenn das Gerät vor kurzem in Betrieb war, fassen Sie es erst wieder an, wenn der Heizblock auf Zimmertemperatur abgekühlt ist.

WICHTIG! Tragen Sie beim Arbeiten mit der Reaktionsplatte pulverfreie Handschuhe.

1. Öffnen Sie das Schubfach des Geräts.

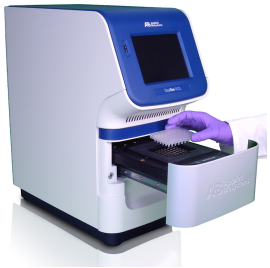


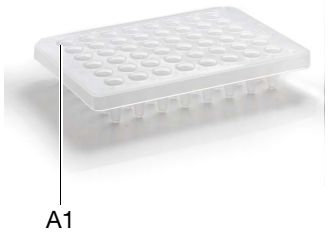


2. Stellen Sie die Reaktionen in den Heizblock.

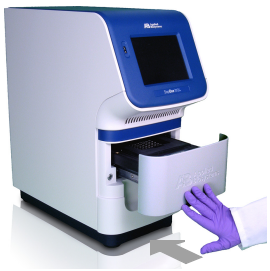
   Die Ausrichtung der Reaktionsplatte hängt von der Art des verwendeten Verbrauchsmaterials ab:

   - Wenn Sie eine Reaktionsplatte verwenden, ist diese mit dem A1-Well hinten links in den Heizblock einzulegen.
   - Wenn Sie Reaktionsgefäßstreifen verwenden, stellen Sie die Streifen in den Heizblock.





3. Schließen Sie das Schubfach des Geräts vorsichtig.



Hinweise

Weitere Informationen

Weitere Informationen zum Einlegen der Reaktionsplatte finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Aktivieren der Benachrichtigungen (optional)

Bei Aktivierung der Benachrichtigungseinstellungen werden Sie von der StepOne™-Software per E-Mail darauf aufmerksam gemacht, wenn das StepOne™-System den Lauf startet und beendet oder beim Lauf ein Fehler auftritt. Die Aktivierung der Benachrichtigungseinstellungen ist optional und wirkt sich nicht auf die Leistung des StepOne™-Systems oder die Dauer des Laufs aus.

WICHTIG! Die Funktion Benachrichtigungseinstellungen ist nur dann verfügbar, wenn der von Ihnen verwendete Computer mit dem StepOne™-System verbunden ist und an ein Ethernet-Netzwerk angeschlossen ist.

Hinweis: Das Benachrichtigungssystem ist auch für Computer verfügbar, die ein StepOne™-System fernüberwachen. Weitere Informationen über Fernüberwachung finden Sie unter „Fernüberwachung“ auf Seite 62.

Informationen zur Beispielanalyse

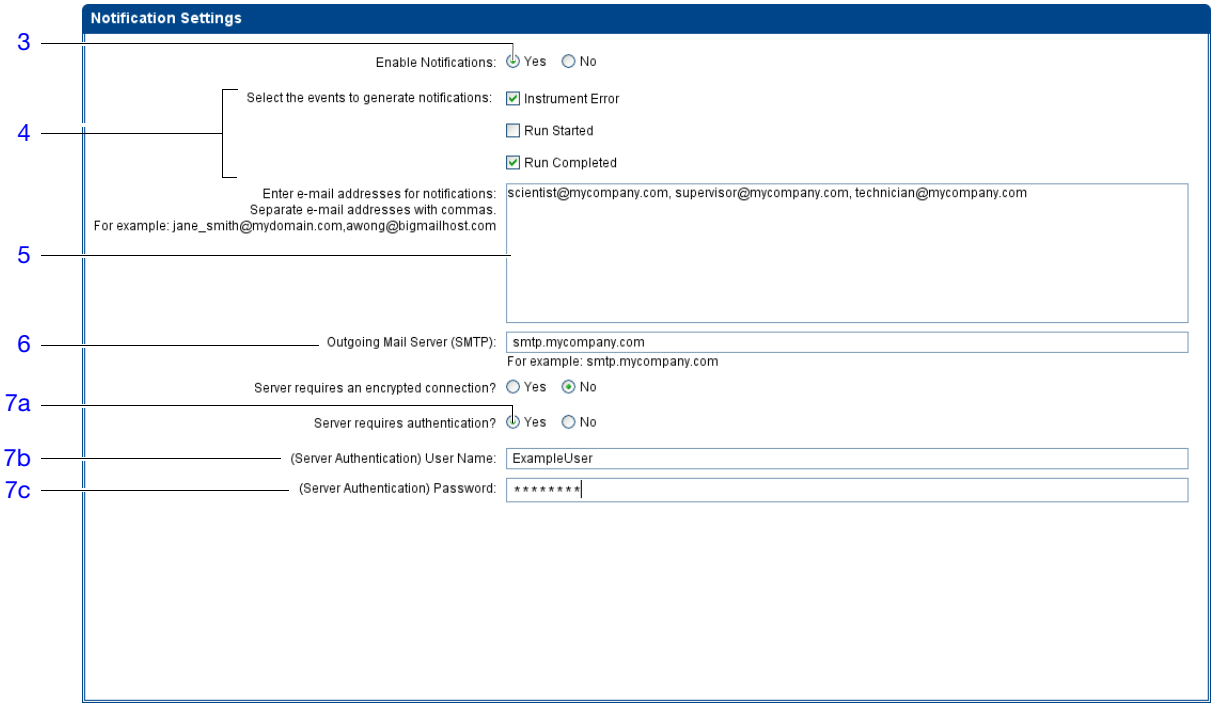
Bei der Beispielanalyse ist die StepOne™-Software so eingerichtet, dass 3 Anwender benachrichtigt werden (Scientist (Wissenschaftler), Supervisor (Laborleiter) und Technician (Techniker) @ mycompany.com), wenn das StepOne™-System den Lauf beendet oder während des Betriebs Fehler auftreten. Der für das Beispiel verwendete SMTP-Server (www.mycompany.com) verwendet SSL-Verschlüsselung (Secure Sockets Layer) und fordert vom Anwender eine Authentifizierung.

Benachrichtigungseinstellungen einrichten

1. Klicken Sie im Navigationsbereich der StepOne™-Software auf **Run** (Lauf).
2. Klicken Sie auf **Notification Settings** (Benachrichtigungseinstellungen).
3. Wählen Sie **Enable Notifications** (Benachrichtigungen aktivieren).
4. Legen Sie die Ereignisse fest, bei denen Benachrichtigungen verschickt werden sollen:
   a. Wählen Sie **Instrument Error** (Gerätefehler).
   b. Wählen Sie **Run Completed** (Lauf abgeschlossen).
5. Klicken Sie auf das Feld **Enter e-mail addresses for notifications** (E-Mail-Adresse für Benachrichtigungen eingeben) und geben Sie **scientist@mycompany.com, supervisor@mycompany.com, technician@mycompany.com** ein.
6. Geben Sie in das Feld **Outgoing Mail Server (SMTP)** (Ausgangsserver) **smtp.mycompany.com** ein.

Hinweise

7. Legen Sie die Authentifizierungseinstellungen fest:
   a. Wählen Sie **No** (Nein) bei Server requires authentication (Server verlangt Authentifizierung).
   b. Klicken Sie in das Feld **User Name** (Benutzername), geben Sie dann den **Supervisor** (Laborleiter) ein.
   c. Klicken Sie in das Feld **Password** und geben Sie ein **Passwort** ein.



Laufhinweise

So richten Sie die automatische Benachrichtigung im StepOne™-System ein:

- Ihr StepOne™-System muss für die Verwendung in einem Netzwerk konfiguriert sein. Siehe *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installationshandbuch*.
- Legen Sie die Ereignisse fest, über die Sie benachrichtigt werden möchten:
  – **Instrument Error** (Gerätefehler) – Veranlasst das StepOne™-System, die angegebenen E-Mail-Empfänger über alle vom StepOne™-System während eines Laufs festgestellten Fehler zu informieren.
  – **Run Started** (Lauf wurde gestartet) – Veranlasst das StepOne™-System, die E-Mail-Empfänger über jeden gestarteten Gerätelauf zu informieren.
  – **Run Completed** (Lauf ist abgeschlossen) – Veranlasst dasStepOne™-System, die E-Mail-Empfänger über jeden abgeschlossenen Gerätelauf zu informieren.
- Erfragen Sie die E-Mail-Adressen der Personen, die benachrichtigt werden sollen.

WICHTIG! Trennen Sie die Adressen durch Kommata voneinander ab (,).

Hinweise

- Fragen Sie Ihren Systemadministrator oder die IT-Abteilung nach folgenden Informationen:
  - Netzwerkadresse eines SMTP-Servers (Simple Mail Transfer Protocol)
  - Ein Benutzername und ein Passwort für den Server, falls für den Zugriff erforderlich.
  - Die SSL-Einstellung (Secure Sockets Layer) des Servers (Ein oder Aus)

Weitere Informationen

Weitere Informationen zum Bildschirm Notification Settings finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Starten der Analyse

Starten Sie den Lauf entsprechend der Konfiguration Ihres StepOne™-System. Wie Sie den Lauf starten, hängt von der Konfiguration Ihres StepOne™-Systems ab:

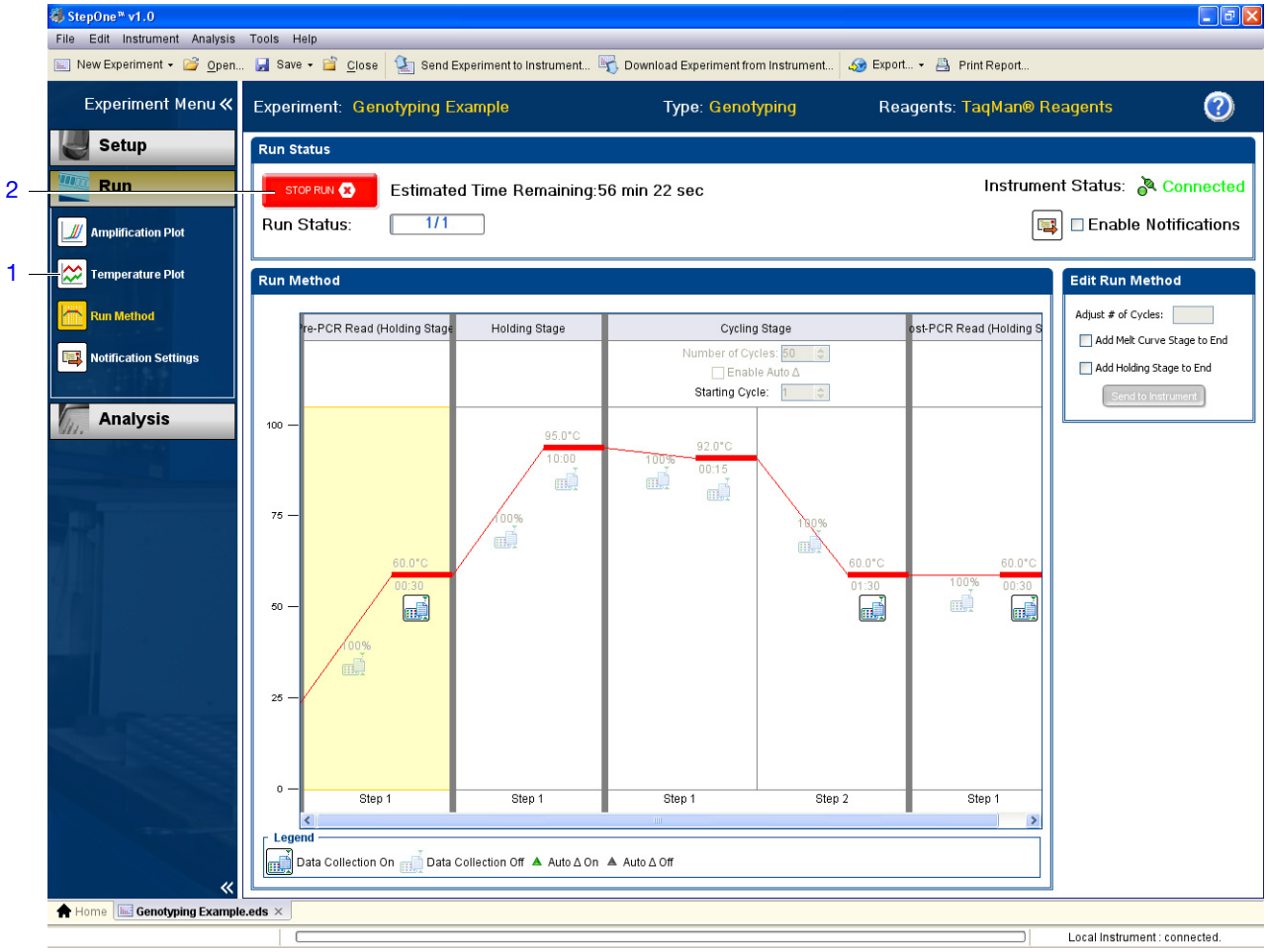
Konfiguration	Beschreibung	Siehe...
Computer-gesteuerte	Das gelbe StepOne™-Systemkabel verbindet den Computer mit dem StepOne™-System	„Computer-gesteuerte Konfiguration starten“ unten
Eigenständig	• Der Computer und das StepOne™-System sind nicht miteinander verbunden, oder • Der Computer und das StepOne™-System sind mit demselben Netzwerk verbunden.	„Eigenständige Konfiguration starten“ auf Seite 52

Computer-gesteuerte Konfiguration starten

Folgen Sie dieser Anleitung, wenn Ihr Computer an das StepOne™-System durch das StepOne™-Systemkabel direkt verbunden ist.

1. Klicken Sie in der StepOne™-Software auf **Temperature Plot** (Temperaturgraph).
2. Klicken Sie auf **START RUN** (LAUF STARTEN).

Hinweise



Eigenständige Konfiguration starten

Folgen Sie dieser Anweisung, wenn Computer und StepOne™-System *nicht* direkt mit dem gelben StepOne™-Systemkabel verbunden sind.

1. Wenn Ihr Computer und das StepOne™-System an dasselbe Netzwerk angeschlossen sind, führen Sie Schritte 1a bis 1f aus. Setzen Sie den Vorgang ansonsten bei Schritt 2 fort.

   a. Klicken Sie in der StepOne™-Software auf **Send Experiment to Instrument** (Analyse an Gerät schicken).

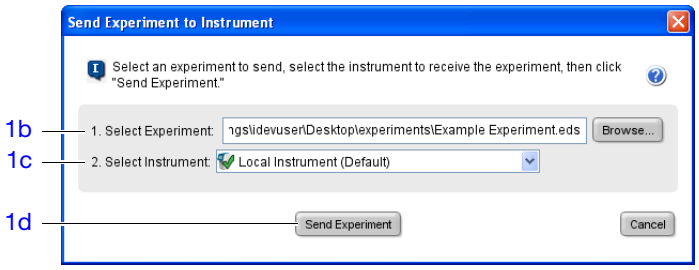
   b. Klicken Sie im Dialogfeld Send Experiment to Instrument (Analyse an Gerät schicken) auf **Browse** (Suchen), wählen Sie die Datei **Genotyping Example.eds**, und klicken Sie dann auf **Open** (Öffnen).

   c. Wählen Sie das gewünschte StepOne™-System aus dem Dropdown-Menü Select Instrument (Gerät auswählen).

      Falls ihr StepOne™-System nicht aufgeführt ist, richten Sie Ihr Gerät zur Überwachung wie im *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installationshandbuch* beschrieben ein.

Hinweise

d. Klicken Sie auf **Send Experiment** (Analyse senden), um die Analyse über das Netzwerk an das StepOne™-System zu schicken.



e. Klicken Sie bei Aufforderung auf **OK**, um das Bestätigungsfenster zu schließen.

f. Setzen Sie den Vorgang bei Schritt 3 fort.

2. Wenn Ihr StepOne™-System nicht mit Ihrem Computer verbunden ist, führen Sie Schritte 2a bis 2d aus, um die Analysedaten über ein USB-Laufwerk zu übertragen.

   a. Schließen Sie das USB-Laufwerk an eine USB-Schnittstelle des Computers an.

   b. Wählen Sie in der StepOne™-Software **Save** ▸ **Save As** (Speichern ▸ Speichern unter).

   c. Gehen Sie im Dialogfeld Save (Speichern) auf das USB-Laufwerk, und klicken Sie dann auf **Save** (Speichern).

   d. Entnehmen Sie das USB-Laufwerk aus dem Computer, und schließen Sie es an die USB-Schnittstelle des StepOne™-Systems an.

3. Berühren Sie den Touchscreen des StepOne™-Systems und anschließend .

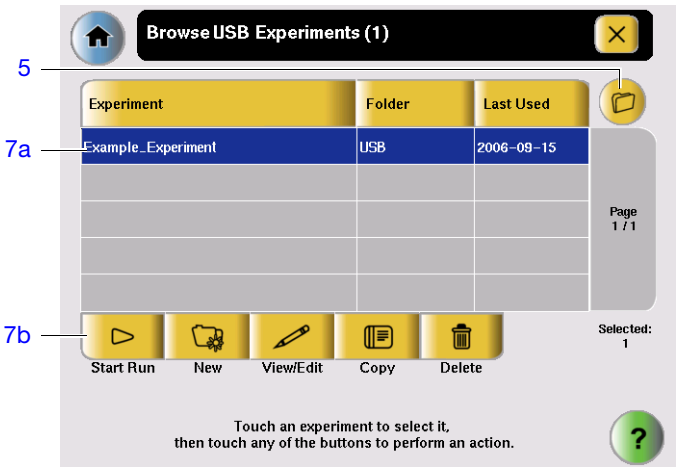
4. Berühren Sie im Bildschirm Main Menu (Hauptmenü) **Browse Experiments** (Analysen durchsuchen).

5. Berühren Sie im Bildschirm Browse Methods (Methoden durchsuchen) (Ordner).

Hinweise

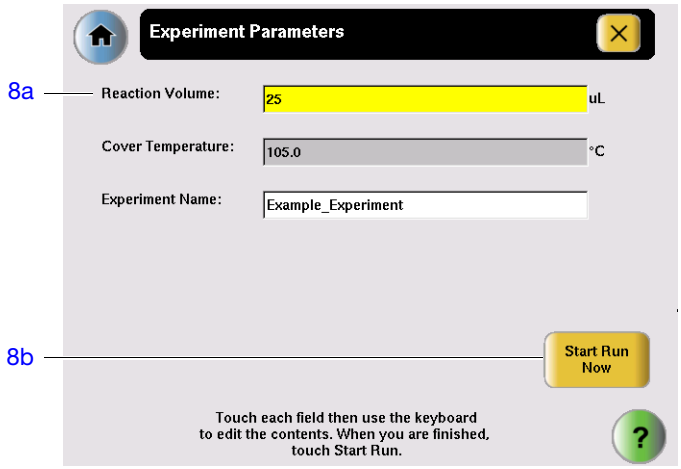
6. Nehmen Sie im Bildschirm Choose an Experiment Category (Analysekategorie wählen) die folgenden Einstellungen vor:
   - Berühren Sie **USB**, wenn Sie die Analysedaten auf ein USB-Laufwerk übertragen haben.
   - Berühren Sie **Default** (Standard), wenn Sie die Analysedaten über eine Netzwerkverbindung versandt haben.

7. Nehmen Sie im Bildschirm Browse USB/Default Experiments (USB/Standardanalysen durchsuchen) die folgenden Einstellungen vor:
   a. Berühren Sie **Example Genotyping Experiment** (Beispiel Genotypisierungsanalyse), um die Analyse auszuwählen.
   b. Berühren Sie **Start Run** (Lauf starten).



8. Nehmen Sie im Bildschirm Run Parameters (Laufparameter) die folgenden Einstellungen vor:
   a. Berühren Sie das Feld **Reaction Volume** (Reaktionsvolumen), geben Sie über den Tastenblock **25** µl ein, und berühren Sie dann **Done** (Fertig).
   b. Berühren Sie **Start Run** (Lauf starten).

Hinweise



Überwachen des Laufs

Überwachen Sie den Verlauf von einem Computer mit StepOne™-Software oder vom Touchscreen des StepOne™-Systems. Wie Sie den Lauf überwachen, hängt von der Konfiguration Ihres StepOne™-Systems ab:

Konfiguration	Beschreibung	Siehe...
Computer-gesteuert	Das StepOne™-Systemkabel verbindet den Computer mit dem StepOne™-System	„Kombinierte Überwachung“ unten
Eigenständig (vernetzt)	Der Computer und das StepOne™-System sind mit demselben Netzwerk verbunden.	„Fernüberwachung“ auf Seite 62
Eigenständig (Basis)	Der Computer und das StepOne™-System sind nicht miteinander verbunden.	„Eigenständige Überwachung“ auf Seite 65

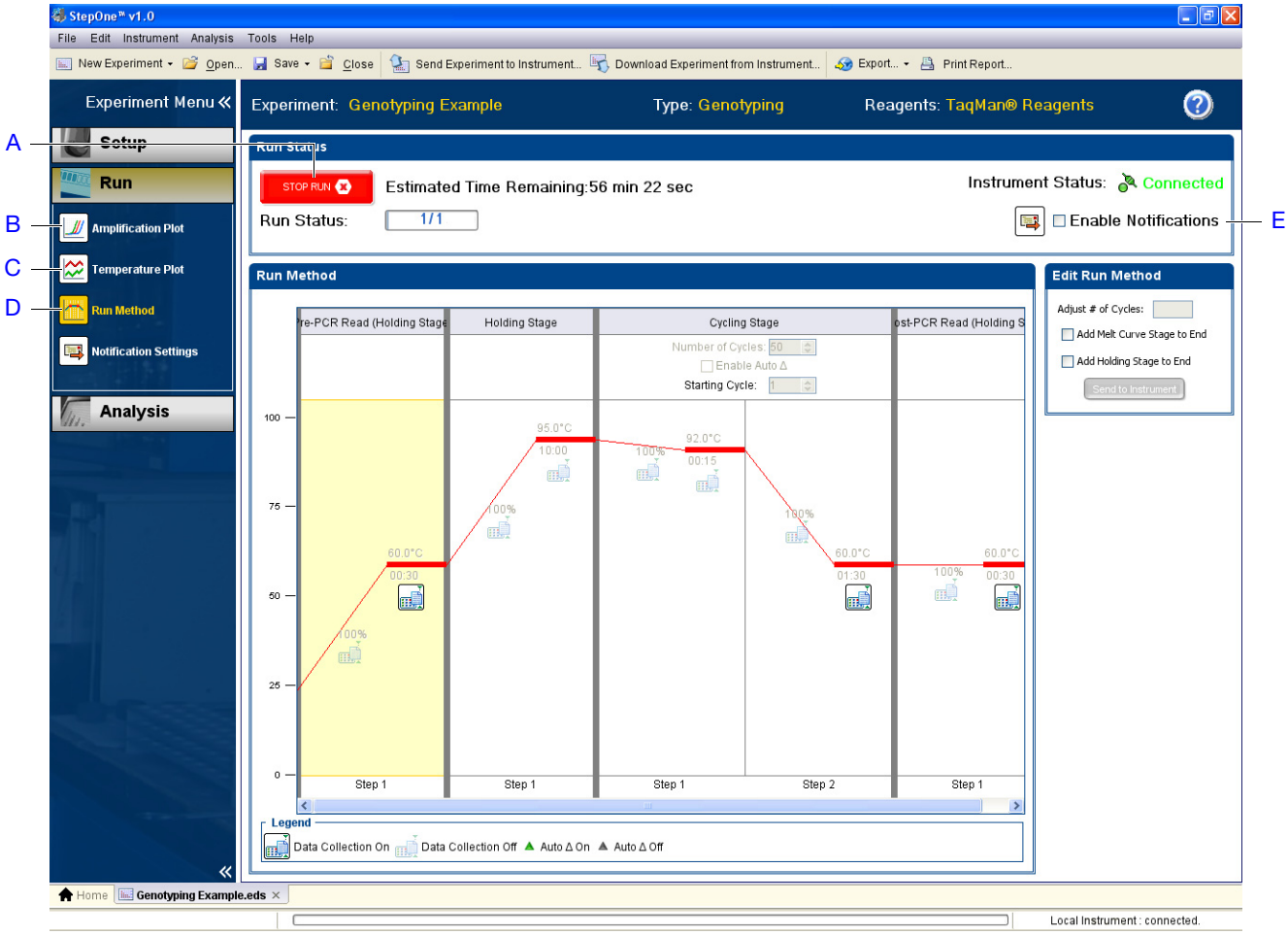
Hinweise

Kombinierte Überwachung

Wenn Ihr Computer über das StepOne™-Systemekabel direkt mit dem StepOne™-System verbunden ist, können Sie den Ablauf der Analyse entsprechend den folgenden Beschreibungen in Echtzeit anzeigen. Prüfen Sie den Lauf auf potenzielle Probleme, indem Sie in regelmäßigen Abständen alle drei verfügbaren Darstellungen der StepOne™-Software aufrufen.

#	Ziel	Aktion
A	Lauf stoppen	1. Klicken Sie in der StepOne™-Software auf **STOP RUN** (LAUF STOPPEN). 2. Klicken Sie im Dialogfeld Stop Run (Lauf stoppen) auf eine der folgenden Optionen: – **Stop Immediately** (Sofort stoppen), um den Lauf sofort zu stoppen. – **Stop after Current Cycle/Hold** (nach aktuellem Zyklus stoppen/anhalten), um den Lauf nach dem aktuellen Zyklus zu stoppen oder anzuhalten. – **Cancel** (Abbrechen), um den Lauf fortzusetzen.
B	Amplifikationsdaten in Echtzeit anzeigen	Wählen Sie **Amplification Plot** (Amplifikationsdarstellung). Siehe „Informationen zur Amplifikationsdarstellung“ auf Seite 58 zu weiteren Informationen über die Darstellung.
C	Temperaturdaten für den Lauf in Echtzeit anzeigen	Wählen Sie **Temperature Plot** (Temperaturgraph). Siehe „Informationen zum Temperaturgraphen“ auf Seite 59 zu weiteren Informationen über die Darstellung.
D	Ablauf in der Laufprofilanzeige verfolgen	Wählen Sie **Run Method View** (Laufprofilanzeige). Siehe „Informationen zur Laufprofilanzeige“ auf Seite 60 zu weiteren Informationen über die Anzeige.
E	Benachrichtigungs-einstellungen aktivieren/deaktivieren	Aktivieren oder deaktivieren Sie **Enable Notifications** (Benachrichtigungen aktivieren).

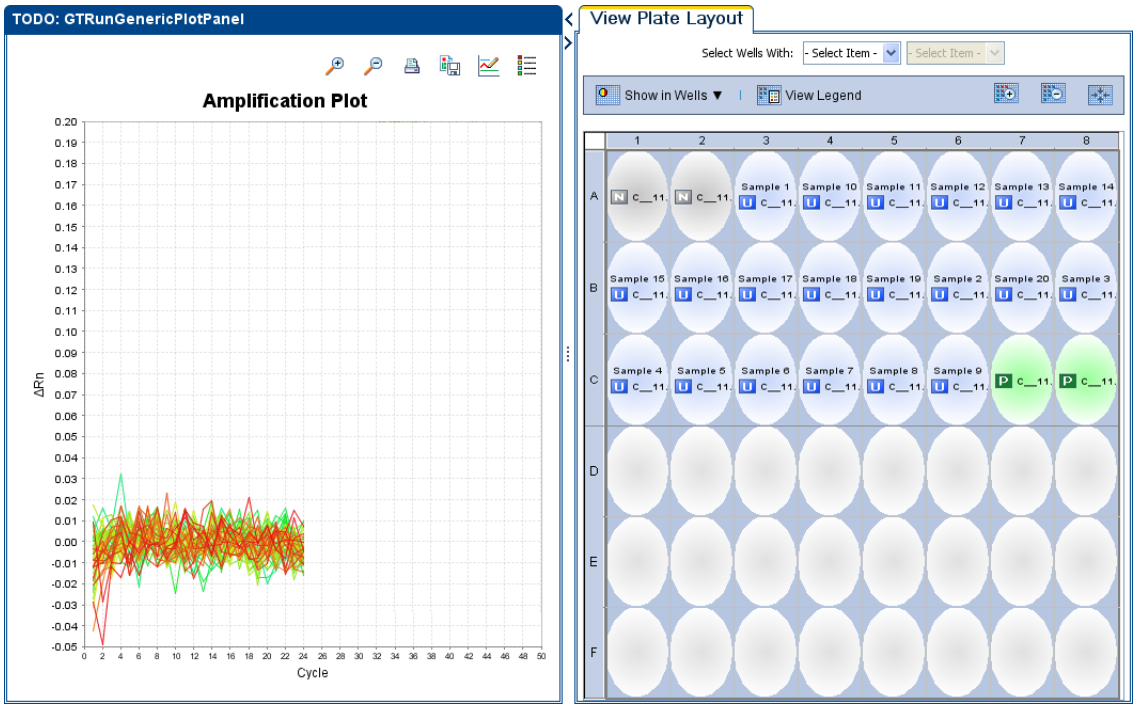
Hinweise


A
B
C
D
E
StepOne™ v1.0
File Edit Instrument Analysis Tools Help
New Experiment Open... Save Close Send Experiment to Instrument... Download Experiment from Instrument... Export... Print Report...
Experiment Menu
Setup
Run
Amplification Plot
Temperature Plot
Run Method
Notification Settings
Analysis
Experiment: Genotyping Example
Type: Genotyping
Reagents: TaqMan® Reagents
Run Status
STOP RUN
Estimated Time Remaining:56 min 22 sec
Instrument Status: Connected
Run Status: 1/1
Enable Notifications
Run Method
Edit Run Method
Adjust # of Cycles:
Add Melt Curve Stage to End
Add Holding Stage to End
Send to Instrument
Holding Stage
Cycling Stage
Number of Cycles: 50
Enable Auto Δ
Starting Cycle: 1
95.0°C
10:00
92.0°C
00:15
60.0°C
00:30
01:30
100%
Step 1
Step 2
Legend
Data Collection On
Data Collection Off
Auto Δ On
Auto Δ Off
Home
Genotyping Example.eds
Local Instrument : connected.

Hinweise

Informationen zur Amplifikationsdarstellung

Im Amplifikationsdarstellungsbildschirm können Sie während eines Laufs über vom StepOne™-System erfassten Fluoreszenzdaten die Amplifikationen Ihrer Proben verfolgen. Wenn eine Methode für die Anzeige von Daten in Echtzeit ausgewählt wurde, zeigt die Amplifikationsdarstellung die Daten der unter dem Reiter View Plate Layout (Plattenbelegung anzeigen) ausgewählten Wells an. Die Darstellung stellt die normalisierte Farbstofffluoreszenz (ΔR_n) der Zyklusnummer gegenüber. Das unten abgebildete Schaubild zeigt die Amplifikationsdarstellung, wie sie in der Beispielanalyse erscheint.



Anhand der Amplifikationsdarstellung können ungewöhnliche Amplifikationen identifiziert und untersucht werden. Ungewöhnliche Amplifikationen sind:

- erhöhte Fluoreszenz in Negativkontroll-Wells
- keine erhöhte Fluoreszenz in Positivkontroll-Wells
- nachweisbare Fluoreszenz zu einem bestimmten Zyklus (ermittelt aus vorherigen ähnlichen Analyseläufen mit den gleichen Reagenzien unter den gleichen Bedingungen)

Wenn Sie eine ungewöhnliche Amplifikation oder das vollständige Fehlen eines Signals feststellen, beheben Sie den Fehler entsprechend den Angaben in der Hilfefunktion der StepOne™-Software (klicken Sie auf in der Symbolleiste, oder wählen Sie **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe)).

Hinweis: Um Daten in der Amplifikationsdarstellung anzuzeigen, wählen Sie die gewünschten Wells unter dem Reiter View Plate Layout (Plattenbelegung anzeigen).

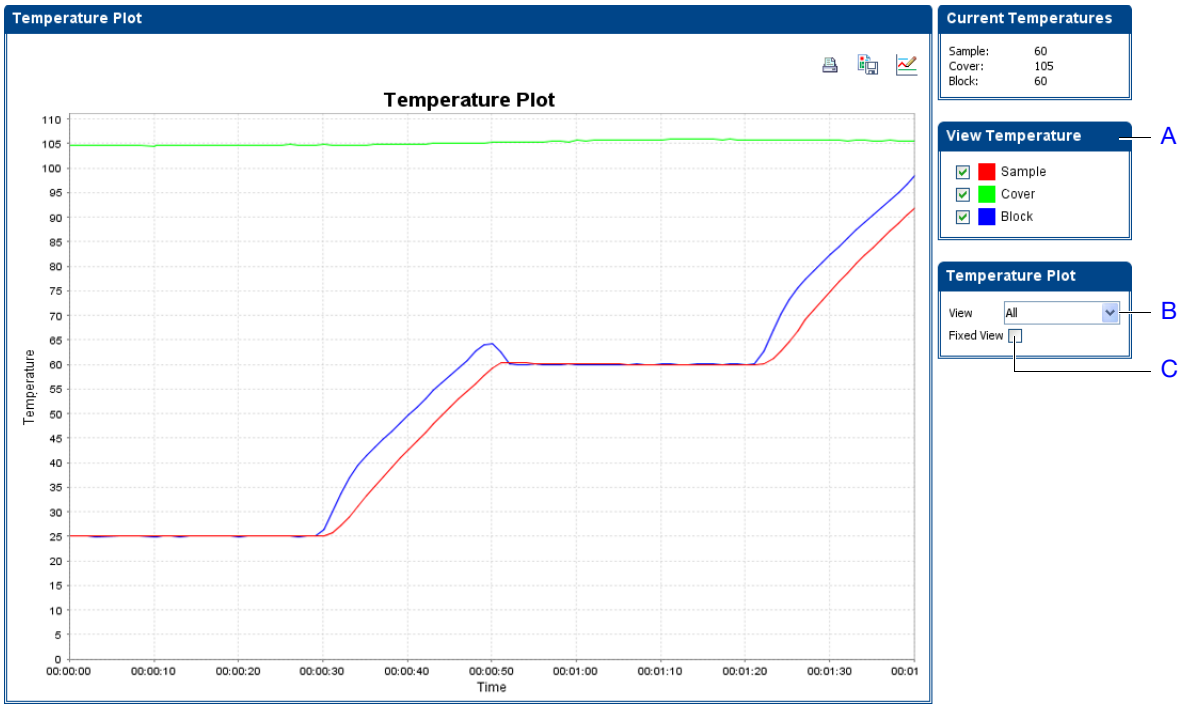
Hinweise

Weitere Informationen zur Amplifikationsdarstellung finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Informationen zum Temperaturgraphen

Während eines Laufs zeigt der Temperaturgraph die Temperaturen des Heizblocks sowie des Heizdeckels und der Proben in Echtzeit (berechnet) an. Das unten abgebildete Schaubild zeigt den Temperaturgraphen der Beispielanalyse.

	Ziel	Aktion
A	Temperaturgraphen hinzufügen/entfernen	Wählen Sie **Sample**, **Heated Cover** (Probe, Heizdeckel) oder **Sample Block** (Heizblock), um die damit jeweils verbundenen Daten in der Darstellung anzuzeigen.
B	Die von der Darstellung angezeigte Uhrzeit ändern	Wählen Sie **View** (Anzeigen) ▸ (Zeitdauer).
C	Y-Achse des Plots fixieren	Wählen Sie **Fixed View** (Fixierte Ansicht).



Der Temperaturgraph kann bei der Identifizierung von Hardware-Fehlern helfen. Prüfen Sie bei der Überwachung des Temperaturgraphen die Darstellungen der Probe, des Heizdeckels und des Heizblocks auf ungewöhnliches Verhalten.

- Normalerweise sollten sich die Darstellungen von Probe und Block ungefähr widerspiegeln. Eine erhebliche Abweichung der Darstellungen kann auf ein Problem hinweisen.

Hinweise

- Die Darstellung des Heizdeckels sollte die bei der Methode angegebene Temperatur konstant halten. Eine Abweichung von der konstanten Temperatur kann auf ein Problem hinweisen.

Wenn Sie einen ungewöhnlichen Temperaturgraphen feststellen, beheben Sie den Fehler entsprechend den Angaben in der Hilfe der StepOne™-Software (klicken Sie auf in der Symbolleiste, oder wählen Sie **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe)).

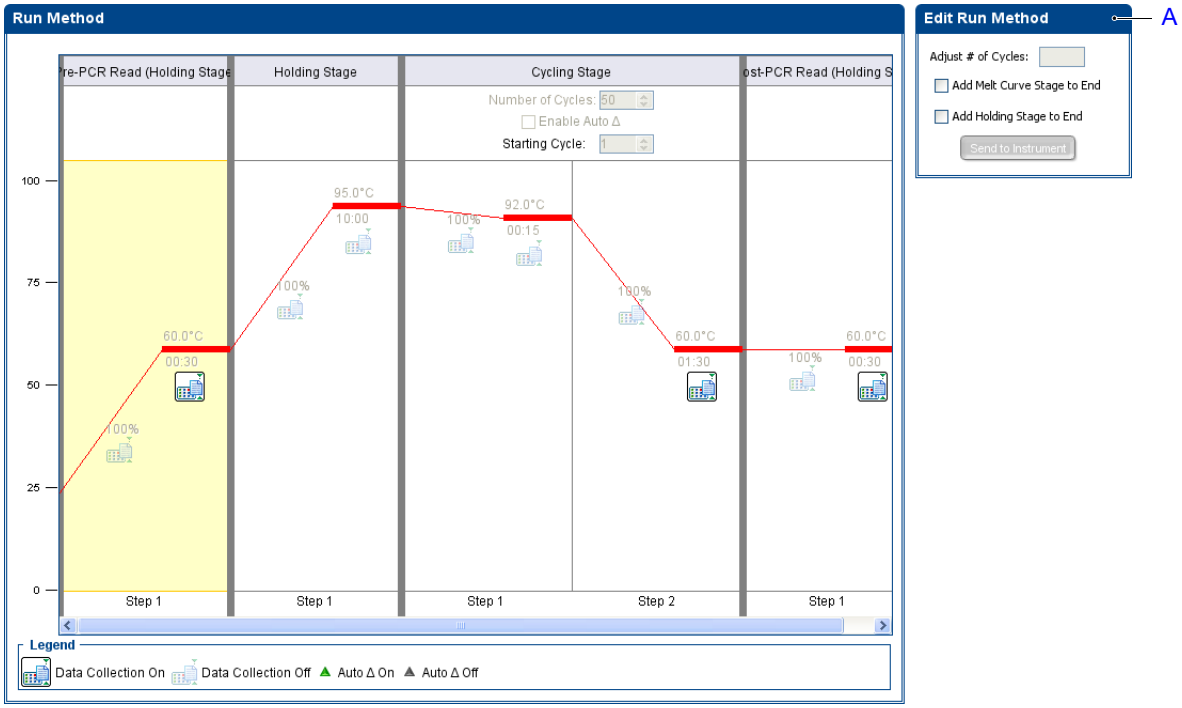
Weitere Informationen zum Temperaturgraphen finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Informationen zur Laufprofilanzeige

Nach Start eines Laufs zeigt das StepOne™-System den Ablauf im Laufprofilbildschirm an. Dieser Bildschirm zeigt den Verlauf in Bezug auf das Thermoprofil des Laufprofils an. Das unten abgebildete Schaubild zeigt den bei der Beispielanalyse angezeigten Lauftypbildschirm.

	Ziel	Aktion
A	Lauftyp ändern (Zyklen, Haltephase oder Schmelzkurve hinzufügen)	1. Klicken Sie im Navigationsbereich auf **Run Method** (Lauftyp). 2. Führen Sie im Lauftypbildschirm eine der folgenden Aktionen aus: – Geben Sie die Anzahl an Zyklen ein, die auf die Zyklusphase anzuwenden sind. – Wählen Sie **Add Melt Curve Stage to End** (Schmelzkurvenphase am Ende zufügen), wenn Sie eine Schmelzkurvenphase am Laufende hinzufügen möchten. – Wählen Sie **Add Holding Stage to End** (Haltephase am Ende zufügen), wenn Sie eine Haltephase am Laufende hinzufügen möchten. 3. Klicken Sie auf **Send to Instrument** (An Gerät senden).

Hinweise



Hinweis: Wenn eine Warnung erscheint, klicken Sie auf den Fehler, um weitere Informationen zu erhalten, und beheben Sie das Problem entsprechend den Erläuterungen in der Hilfe der StepOne™-Software (klicken Sie auf in der Symbolleiste, oder wählen Sie **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe)).

Weitere Informationen zur Lauftypanzeige finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

4

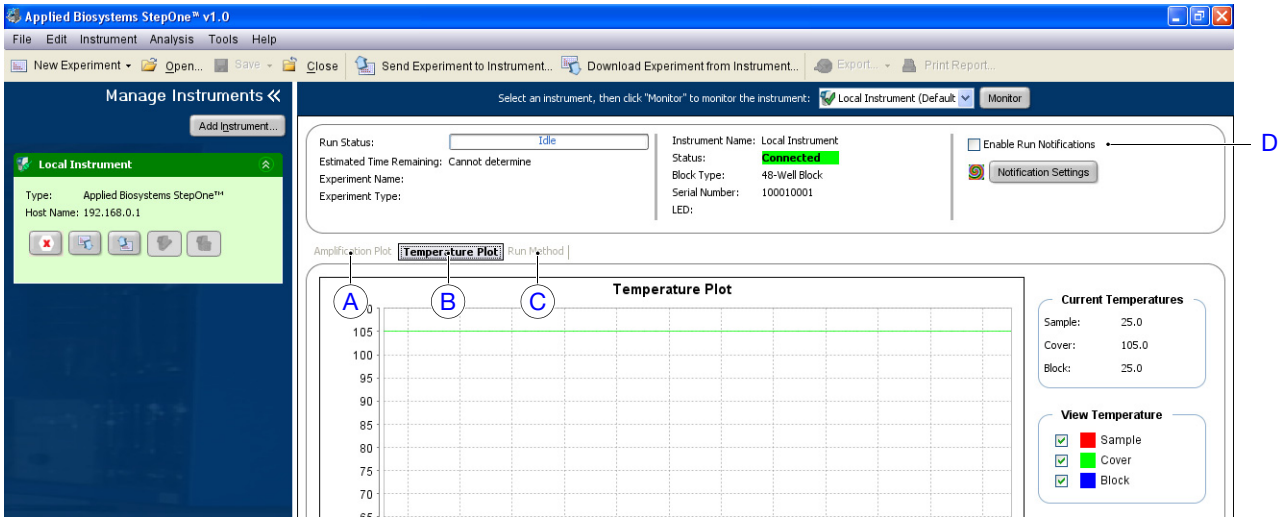
Hinweise

Fernüberwachung

Wenn Ihr StepOne™-System an ein Netzwerk angeschlossen ist, können Sie die Fernüberwachungsfunktion der StepOne™-Software verwenden, um den Ablauf in Echtzeit auf einem beliebigen Computer des Netzwerks anzuzeigen.

WICHTIG! Vernetzte Computer können das StepOne™-System nicht steuern, sondern nur überwachen.

#	Ziel	Aktion
A	Amplifikationsdaten in Echtzeit anzeigen	Klicken Sie auf **Amplification Plot** (Amplifikationsdarstellung). Siehe „Informationen zur Amplifikationsdarstellung“ auf Seite 58 zu weiteren Informationen über die Darstellung.
B	Temperaturdaten für den Lauf in Echtzeit anzeigen	Klicken Sie auf **Temperature Plot** (Temperaturgraph). Siehe „Informationen zum Temperaturgraphen“ auf Seite 59 zu weiteren Informationen über die Darstellung.
C	Ablauf in der Lauftypanzeige verfolgen	Klicken Sie auf **Run Method View** (Lauftypanzeige). Siehe „Informationen zur Laufprofilanzeige“ auf Seite 60 zu weiteren Informationen über die Anzeige.
D	Benachrichtigungs-einstellungen aktivieren/deaktivieren	Aktivieren oder deaktivieren Sie **Enable Notifications** (Benachrichtigungen aktivieren). Siehe „Aktivieren der Benachrichtigungen (optional)“ auf Seite 49 zu weiteren Informationen über die Benachrichtungseinstellungen.



Zur Fernüberwachung des StepOne™-Systems gehen Sie wie folgt vor:

1. Wählen Sie in der StepOne™-Software **Instrument ▸ Remote Monitor** (Gerät ▸ Fernüberwachung).

Hinweise

2. Wählen Sie in der Navigationsleiste Ihr StepOne™-System.

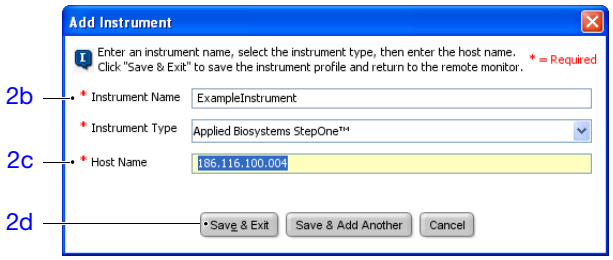
   Falls die Navigationsleiste Ihr StepOne™-System nicht auflistet, gehen Sie wie folgt vor:

   a. Klicken Sie auf **Add Instrument** (Gerät hinzufügen).

   b. Klicken Sie auf das Feld **Instrument Name** (Gerätename), und geben Sie dann den Namen des Geräts ein.

   c. Klicken Sie auf das Feld **Host Name** (Host-Name), und geben Sie die IP-Adresse des Geräts ein.

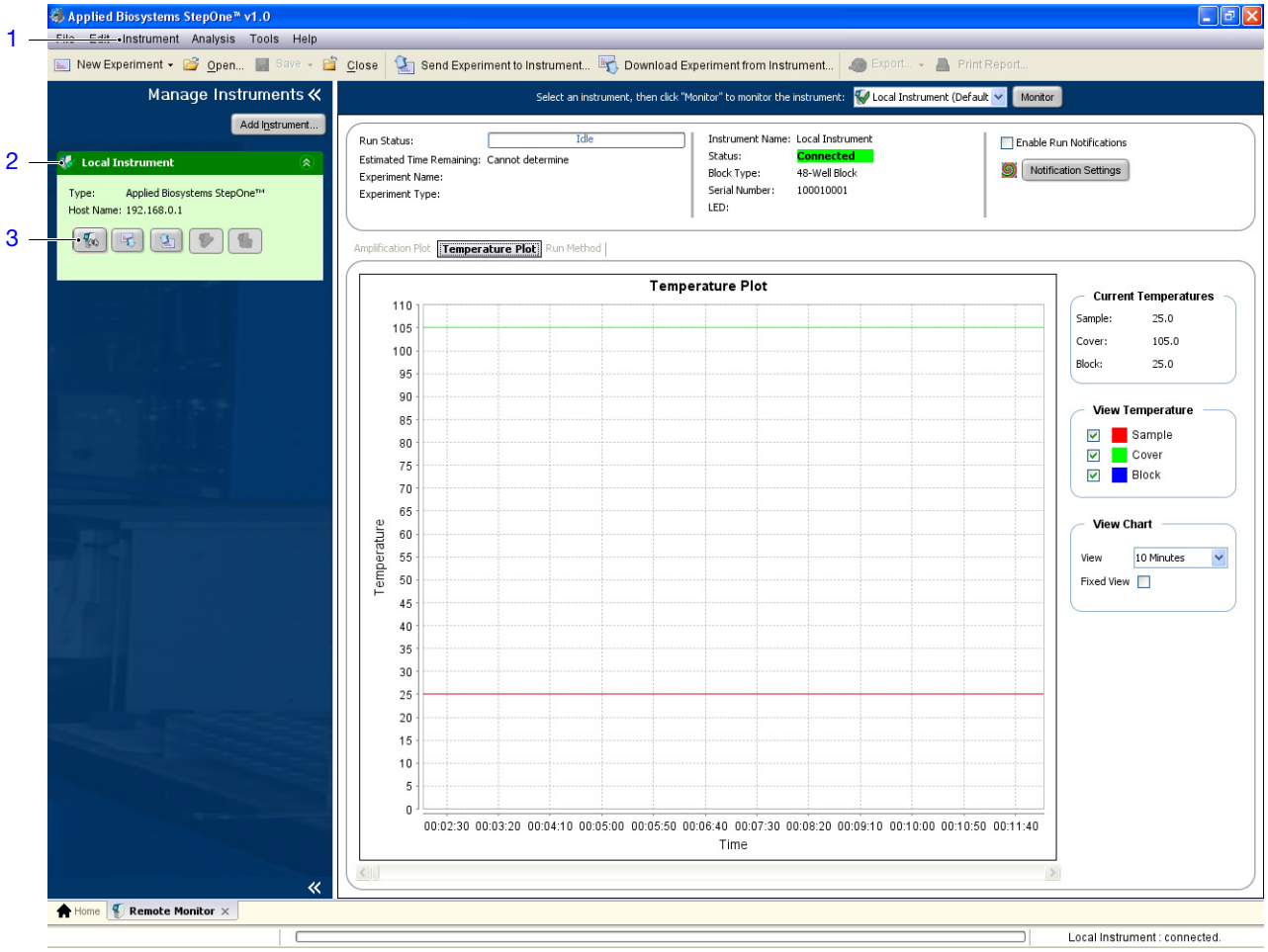
   d. Klicken Sie auf **Save & Exit** (Speichern und beenden).



Hinweis: Weitere Informationen zur Konfiguration des StepOne™-Systems zur Verwendung im Netzwerk oder zur Fernüberfachung finden Sie im *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System-Handbuch zu Installation, Netzwerkeinbindung und Wartung*.

Hinweise

3. Klicken Sie für Ihr Gerät auf (Überwachung dieses Geräts starten).

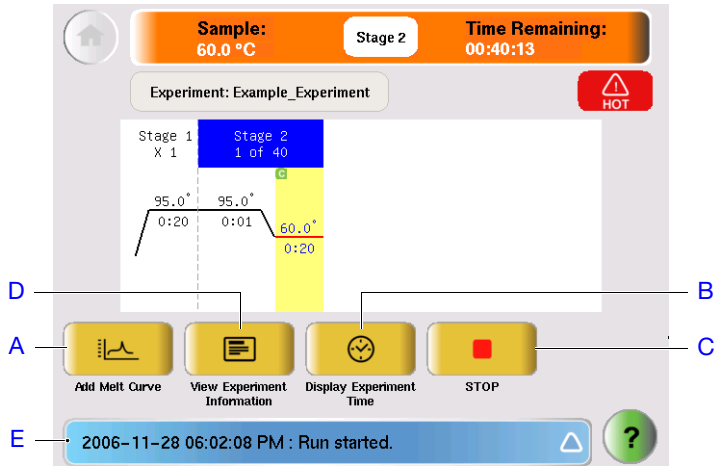


Hinweise

Eigenständige Überwachung

Wenn Sie den Lauf auf dem StepOne™-System gestartet haben, können Sie den Ablauf auf dem Touchscreen verfolgen. Der Lauftypbildschirm zeigt die Analysemethode an und hebt die vom Gerät ausgeführten Thermoprofilphasen hervor.

#	Ziel	Aktion
A	Dem Lauf eine Schmelzkurve hinzufügen	Berühren Sie (Schmelzkurve hinzufügen), und berühren Sie dann **OK**.
B	Die verbleibende Zeit für den Lauf anzeigen	Berühren Sie **Display Experiment Time** (Analysezeit anzeigen), und berühren Sie dann ×, um zum Bildschirm Run Method zurückzukehren.
C	Lauf stoppen	Berühren Sie erst **Stop** und dann die folgenden Schaltflächen: • **Stop**, um den Lauf zu stoppen bzw. anzuhalten, nachdem das StepOne™-System den aktuellen Zyklus beendet hat. • **Abort** (Abbrechen), um den Lauf unverzüglich abzubrechen. • ×, um den Lauf unverändert fortzusetzen.
D	Analyseinformationen anzeigen	Berühren Sie erst **View Experiment Information** (Analyseinformationen anzeigen) und dann ×, um zum Lauftypbildschirm zurückzukehren.
E	Fehlerprotokoll anzeigen	Berühren Sie die Statusleiste, um das Fehlerprotokoll anzuzeigen.



Hinweise

Entnehmen der Reaktionsplatte und Übertragen der Daten

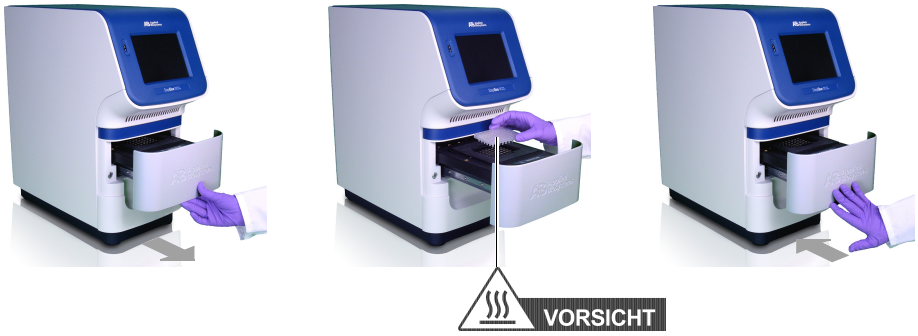
Sobald das StepOne™-System das Hauptmenü anzeigt, entnehmen Sie die Reaktionsplatte aus dem StepOne™-System, und übertragen Sie die Analysedaten zur Analyse auf den Computer.

Entnehmen der Reaktionsplatte

VORSICHT **VERLETZUNGSGEFAHR** Beim Betrieb des Geräts kann die Temperatur des Heizblocks auf über 100 °C ansteigen. Halten Sie sich solange vom Heizblock fern, bis er auf Zimmertemperatur abgekühlt ist.

Hinweis: Wenn das StepOne™-System einen Lauf abgeschlossen hat, speichert das System die Laufinformationen bis zum Abschluss des nächsten Gerätelaufs im Laufprotokoll.

1. Wenn auf dem Touchscreen der StepOne™-System das Hauptmenü erscheint, berühren Sie .
2. Öffnen Sie das Schubfach des Geräts.
3. Entnehmen Sie die Reaktionsplatte aus dem Heizblock.
4. Schließen Sie das Schubfach des Geräts vorsichtig.



WICHTIG! Schalten Sie das StepOne™-System nach der Durchführung einer Analyse nicht ab. Das Gerät schaltet automatisch in einen Ruhezustand, wenn es nicht im Gebrauch ist.

Weitere Informationen zum Entladen des StepOne™-Systems finden Sie in der Hilfe der StepOne™-Software, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Hinweise

Datenübertragungsmethode auswählen

Die Übertragung der Analyse zur Auswertung auf den Computer erfolgt in Abhängigkeit von der Konfiguration des StepOne™-Systems:

Konfiguration	Beschreibung	Siehe...
Computer-gesteuert	Das StepOne™-Systemkabel verbindet den Computer mit dem StepOne™-System	„Computer-gesteuerte Datenübertragung“ unten
Eigenständig (vernetzt)	Der Computer und das StepOne™-System sind mit demselben Netzwerk verbunden.	„Fernüberwachung“ auf Seite 62
Eigenständig (Basis)	Der Computer und das StepOne™-System sind nicht miteinander verbunden.	„Eigenständige Überwachung“ auf Seite 65

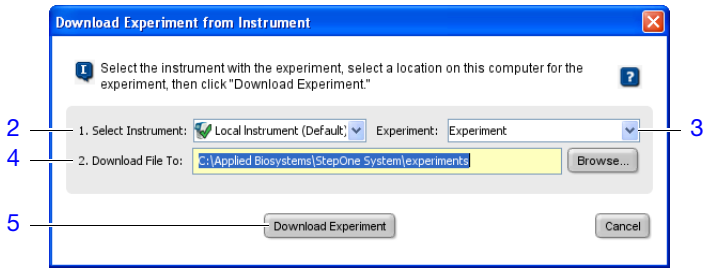
Computer-gesteuerte Datenübertragung

Wenn Ihr Computer über das StepOne™-Systemkabel direkt mit dem StepOne™-System verbunden ist, müssen Sie nichts unternehmen. Die StepOne™-Software überträgt die Analysedaten nach dem Lauf automatisch an das StepOne™-System.

Fernübertragung

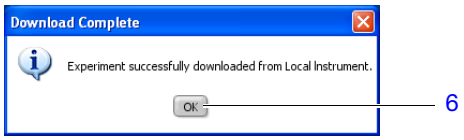
Wenn Ihr Computer und das StepOne™-System mit demselben Ethernet-Netzwerk verbunden sind, schicken Sie die Analysedaten über das Netzwerk an das StepOne™-System:

1. Klicken Sie in der StepOne™-Software auf **Download Experiment to Instrument** (Analyse in das Gerät herunterladen).
2. Wählen Sie im Dialogfeld Download Experiment from Instrument (Analyse vom Gerät herunterladen) auf **Select Instrument** ▸ *<your instrument>* (Gerät auswählen ▸ *<Ihr Gerät>*).
3. Wählen Sie **Experiment** ▸ **Genotyping_Example.eds**.
4. Klicken Sie im Feld Download File To (Datei speichern unter) auf **Browse** (Suchen), wählen Sie den Ordner, in dem die Analysedaten gespeichert werden sollen, und klicken Sie auf **Select** (Wählen).
5. Klicken Sie auf **Download Experiment** (Analyse herunterladen), um die Analyse über das Netzwerk vom StepOne™-System auf den Computer herunterzuladen.



Hinweise

6. Klicken Sie bei Aufforderung auf **OK**, um das Bestätigungsfenster zu schließen.



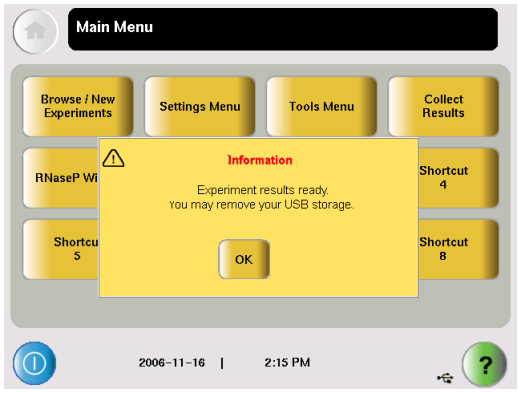
Eigenständige Datenübertragung

Wenn Ihr Computer nicht mit dem StepOne™-System verbunden ist, übertragen Sie die Analysedaten mithilfe des USB-Laufwerks vom StepOne™-System:

1. Wenn das Gerät noch nicht mit einem USB-Laufwerk verbunden ist, schließen Sie das Laufwerk an die USB-Schnittstelle an.

2. Aktivieren Sie den Touchscreen des StepOne™-Systems durch eine Berührung, und berühren Sie anschließend .
3. Berühren Sie im Main Menu (Hauptmenü) **Collect Results** (Ergebnisse anzeigen), um die Daten auf dem USB-Laufwerk zu speichern.

   Wenn das StepOne™-System das USB-Laufwerk nicht finden kann, drücken Sie auf **OK**, warten Sie 30 Sekunden, und drücken Sie dann noch einmal auf **Collect Results** (Ergebnisse anzeigen).
4. Sobald die erfolgreiche Übertragung der Daten gemeldet wurde, berühren Sie **OK**.



5. Entnehmen Sie das USB-Laufwerk aus dem StepOne™-System, und schließen Sie es an die USB-Schnittstelle des Computers an.

Hinweise

6. Greifen Sie auf dem Computer-Desktop über den Windows-Explorer auf das USB-Laufwerk zu.

7. Kopieren Sie die Datei **Genotyping Example.eds** auf
   <drive (Laufwerk)>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments,
   wobei *<drive (Laufwerk)>* das Installationsverzeichnis der StepOne™-Software ist.

Hinweise

Hinweise

5 Analyseauswertung

Dieses Kapitel umfasst die folgenden Themen:

- Kapitelübersicht 72
- Öffnen der Analyse zur Auswertung. 73
- Ansicht der Alleldiskriminierungs darstellung. 74
- Ansicht der Plattenbelegung 78
- Ansicht der Well-Tabelle 80
- Ansicht der Zusammenfassung zur Qualitätskontrolle. 84
- Ansicht der Rohdatendarstellung 86
- Ansicht der Multikomponentendarstellung 88
- Ansicht der Amplifikationsdarstellung. 90
- Ansicht der Auswertungseinstellungen. 95
- Veröffentlichen der Daten 100

Hinweis: Weitere Informationen über ein Thema dieses Handbuchs finden Sie in der Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software, indem Sie entweder **F1** drücken, in der Symbolleiste auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Hinweise

Kapitelübersicht

In diesem Kapitel wird erläutert, wie die Analyse eingesehen, ausgewertet und veröffentlicht werden kann.

Arbeitsablauf

Analyse starten

▼

Analysedesign einrichten (Kapitel 2)

▼

Reaktionen ansetzen (Kapitel 3)

▼

Analyse durchführen (Kapitel 4)

▼

Analyseauswertung (Kapitel 5)

1. Ansicht des Alleldiskriminierungsplot
2. Ansicht der Plattenbelegung
3. Ansicht der Well-Tabelle
4. Ansicht der QC-Zusammenfassung
5. Ansicht der Rohdatendarstellung
6. Ansicht der Multikomponentendarstellung
7. Ansicht der Amplifikationsdarstellung
8. Ansicht der Auswertungseinstellungen
9. Daten auswerten

▼

Analyse beenden

So werden die Ergebnisse beurteilt

Die Prüfung der Ergebnisse erfolgt in drei Schritten:

1. Führen Sie zunächst eine erste Prüfung der Alleldiskriminierungs-Darstellung (siehe Seite 74), der Plattenbelegung (siehe Seite 78) und der Well-Tabelle (siehe Seite 80) durch, um die von der StepOne™-Software erstellten Genotypbestimmungen zu beurteilen.

2. Prüfen Sie die Zusammenfassung zur Qualitätskontrolle (siehe Seite 84), um die Proben zu beurteilen, die QC-Markierungen erhalten haben. Prüfen Sie die Rohdaten (siehe Seite 86) und die Amplifikationsdaten (siehe Seite 90) auf Proben, die eine anormale Amplifikation aufweisen.

3. Falls nötig, legen Sie die Auswertungseinstellungen fest (siehe Seite 95) oder ändern Sie die Bestimmungen manuell (siehe Seite 99).

Nach Beurteilung der Ergebnisse können Sie diese wie unter „Veröffentlichen der Daten“ auf Seite 100 beschrieben veröffentlichen.

Hinweise

Öffnen der Analyse zur Auswertung

Bereiten Sie sich auf die Auswertung vor, indem Sie die Analyse öffnen.

Informationen zu den Beispieldaten

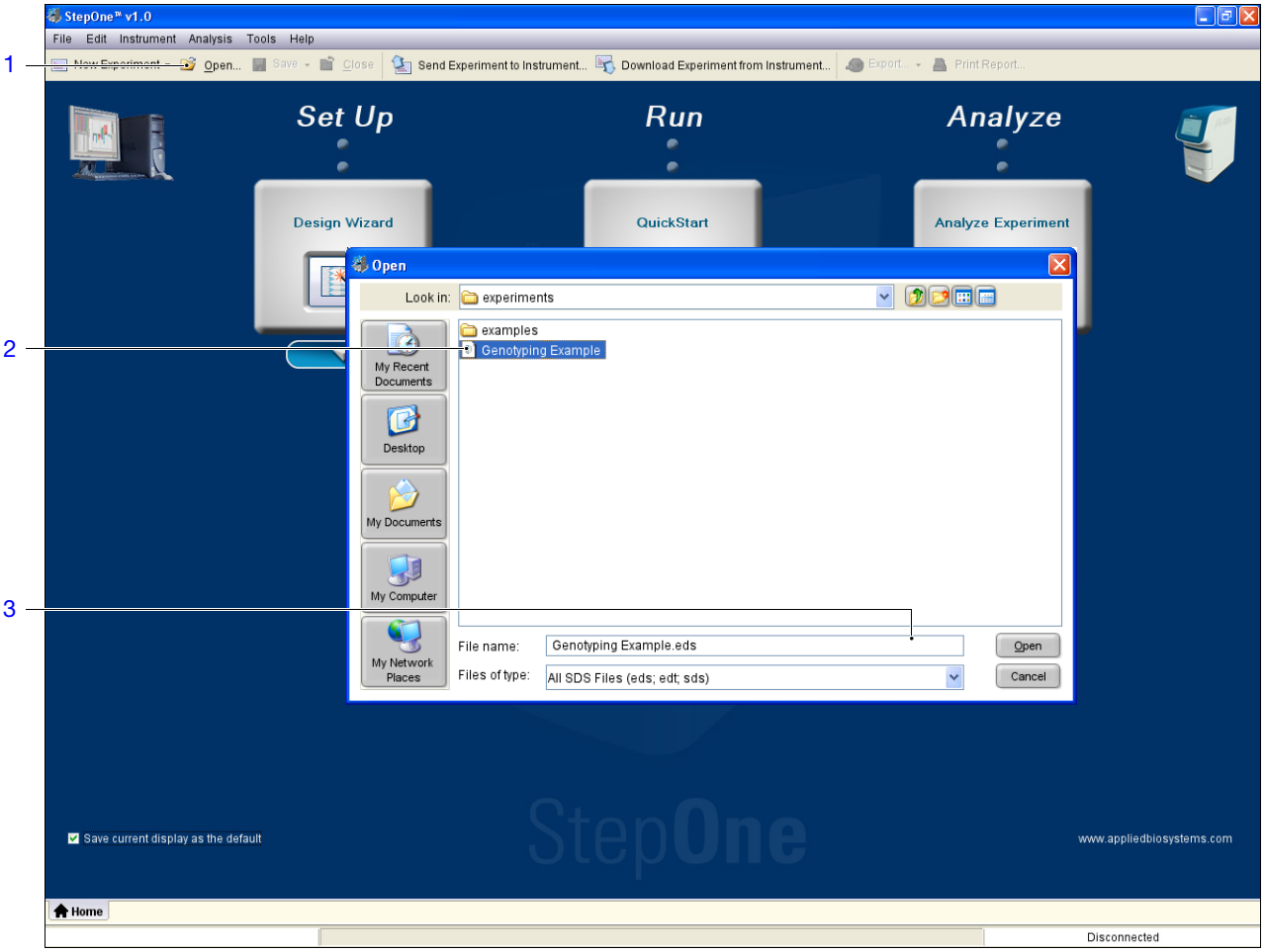
Die Beispielanalyse finden Sie unter:

<drive (Laufwerk)>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples

wobei *<drive (Laufwerk)>* für das Computerlaufwerk steht, auf dem die StepOne™-Software installiert wurde. Das Standardinstallationslaufwerk ist C.

Analyse öffnen

1. Klicken Sie in der StepOne™-Software auf **Open** (Öffnen).
2. Wählen Sie **Genotyping Example.eds**.
3. Klicken Sie auf **Open** (Öffnen).



Weitere Informationen

Weitere Informationen finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Hinweise

Ansicht der Amplifikationsdarstellung

Führen Sie eine erste Prüfung der Analyseergebnisse in der Alleldiskriminierungs-Darstellung durch, welche die normalisierte Reporter-Farbstofffluoreszenz (R_n) für Allel-spezifische Sonden des SNP-Assay kontrastiert. Unter „Platten lesen und auswerten“ auf Seite 6 finden Sie eine ausführliche Beschreibung der Darstellung.

Informationen zu den Beispieldaten

Überzeugen Sie sich, dass die Alleldiskriminierungs-Darstellung für die Beispielanalyse Folgendes anzeigt:

- Cluster für die drei möglichen Genotypen (Allel 1 homozygot, Allel 2 homozygot und Allel 1/2 heterozygot)
- Einen Cluster für die Negativkontrolle

Darstellung prüfen

1. Wählen Sie im Navigationsbereich **Allelic Discrimination Plot**.
2. Wählen Sie aus dem Menü SNP Assay **C__11711420_30**.
   - Falls der Autocaller aktiviert ist, zeigt die Alleldikriminierungsdarstellung Allel-Symbole für jede Probe, die für den gewählten SNP anlaysiert wurde.

     Die Proben sind in der Darstellung wie folgt gruppiert:

Symbol	Gruppierung	Genotypen der Proben
● (rot)	x-Achse der Darstellung	Homozygot für Allel 1 des ausgewählten SNP-Assay
● (blau)	y-Achse der Darstellung	Homozygot für Allel 2 des ausgewählten SNP-Assay
● (grün)	Mitte zwischen den homozygoten Clustern	Heterozygot für beide Allels des ausgewählten SNP-Assays (Allele 1 und Allele 2)
■ (schwarz)	linke untere Ecke der Darstellung	Negativkontrolle
× (schwarz)	an einer beliebigen Stelle in der Darstellung	unbestimmt

   - Ist der Autocaller nicht aktiviert, zeigt die Alleldiskriminierungs-Darstellung für jede Probe ein Kreuz (× - unbestimmt) an.
3. Gehen Sie bei jedem Cluster in der Darstellung wie folgt vor:
   a. Klicken und ziehen Sie ein Feld um den Cluster, um die dazugehörigen Wells in der Plattenbelegung und in der Well-Tabelle auszuwählen.
   b. Überzeugen Sie sich, dass die erwarteten Wells in der Well-Tabelle ausgewählt sind.

      Wenn Sie beispielsweise den Cluster in der Ecke links unten in der Darstellung auswählen, sollten nur die Negativkontrollen ausgewählt sein. Das Vorhandensein einer Unbekannten unter den Negativkontrollen könnte darauf hinweisen, dass die Amplifikation der Probe fehlgeschlagen ist.

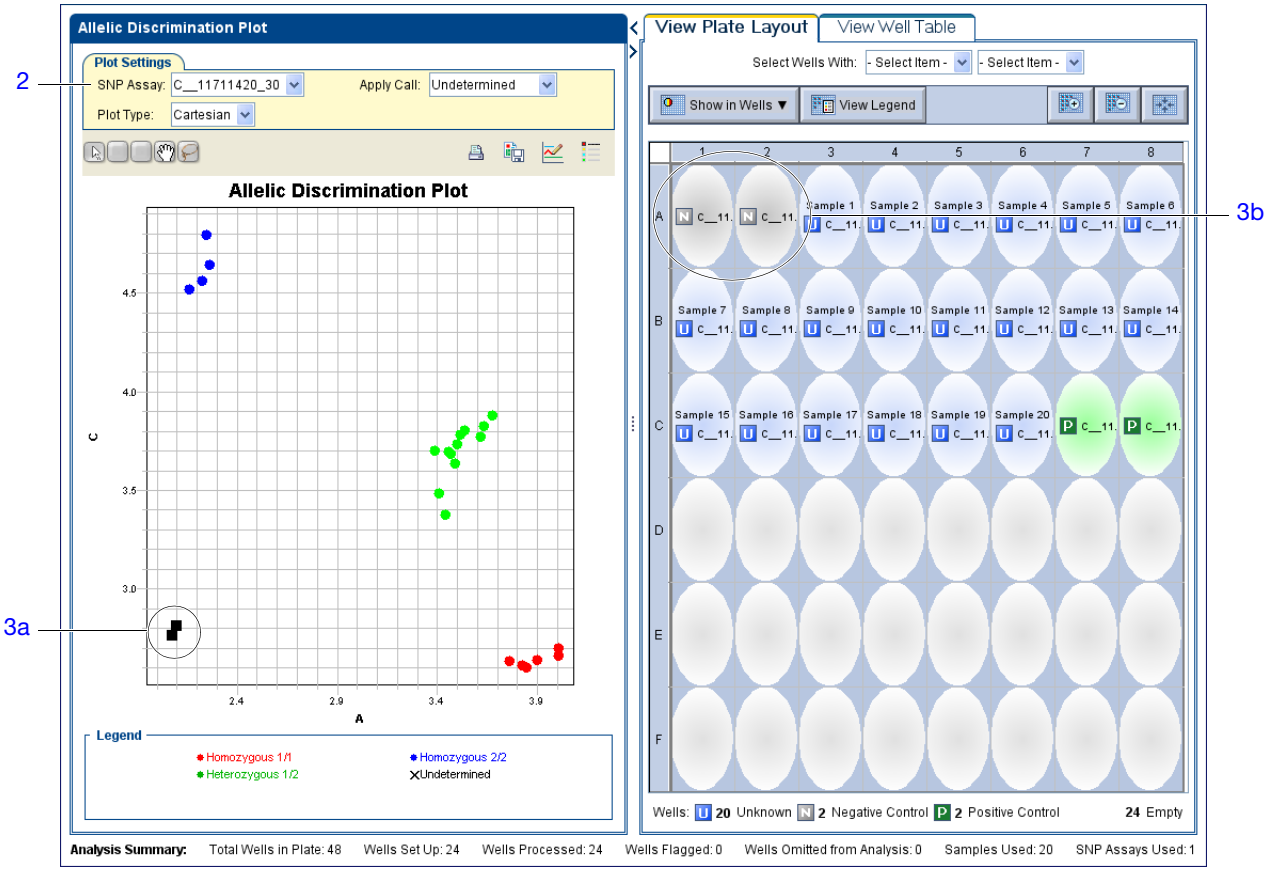
Hinweise

c. Wiederholen Sie Schritte 3a und 3b für alle anderen Cluster in der Darstellung.

Element	Beschreibung
SNP Assay Dropdown-Menü	Bestimmt die Daten des SNP-Assays, die von der StepOne™-Software in der Darstellung angezeigt werden.
Plot Type Dropdown-Menü	Legt den Darstellungstyp (Cartesian oder Polar) fest, den die StepOne™-Software für die Anzeige der Daten verwendet.
Apply Call Dropdown-Menü	Wenn ein Datenpunkt ausgewählt ist, können Sie über dieses Menü einem Datenpunkt innerhalb des Scatterplots eine Allelbestimmung zuweisen.
Toolbar	Enthält Werkzeuge zur Bearbeitung des Scatterplots. • – Wählt Datenpunkte durch Anklicken einzelner Datenpunkte oder durch Klicken und Ziehen eines Felds um eine Datenpunktgruppe aus. • – Wählt Datenpunkte durch Einkreisen aus. • – Positioniert den Scatterplot neu. • – Vergrößert den Scatterplot. • – Zoomt aus dem Scatterplot heraus.
Legende	Erläuterung der Symbole im Scatterplot.

In der Abbildung unten ist die Alleldiskriminierungs-Darstellung der Beispielanalyse dargestellt.

Hinweise


2
3a
3b
Allelic Discrimination Plot
Plot Settings
SNP Assay: C__11711420_30
Apply Call: Undetermined
Plot Type: Cartesian
Allelic Discrimination Plot
Legend
Homozygous 1/1
Heterozygous 1/2
Homozygous 2/2
Undetermined
View Plate Layout
View Well Table
Select Wells With:
Show in Wells
View Legend
Wells: U 20 Unknown N 2 Negative Control P 2 Positive Control 24 Empty
Analysis Summary: Total Wells in Plate: 48 Wells Set Up: 24 Wells Processed: 24 Wells Flagged: 0 Wells Omitted from Analysis: 0 Samples Used: 20 SNP Assays Used: 1

Auswertungs-hinweise

Beachten Sie bei der Auswertung Ihrer eigenen Analyse Folgendes:

- Bestätigen Sie, dass alle Kontrollen den richtigen Genotyp aufweisen.
- Wenn Sie Positivkontrollen verwenden, bestätigen Sie die Bestimmungen für die Positivkontrollen:

  a. Wählen Sie aus der Well-Tabelle die Wells aus, die eine Positivikontrolle enthalten, um die entsprechenden Datenpunkte in der Alleldiskriminierungs-Darstellung zu markieren.

  b. Prüfen Sie, dass sich die Datenpunkte für die Positivkontrollen entlang der erwarteten Achse der Darstellung anhäufen. Wenn Sie beispielsweise das Positivkontroll-Allel 1/Allel 1 wählen, sollten sich die Kontrollen entlang der x-Achse anhäufen.

  c. Wiederholen Sie die Schritte a und b für die Wells, die andere Positivkontrollen enthalten.

Hinweise

- Untersuchen Sie die Negativkontroll-Cluster auf unbekannte Proben, die nicht amplifiziert wurden:
  a. Wählen Sie die Datenpunkte des Clusters in der Ecke unten links der Alleldiskriminierungs-Darstellung, um die entsprechenden Zeilen der Well-Tabelle auszuwählen.
  b. Prüfen Sie, dass die ausgewählten Wells in der Well-Tabelle Negativkontrollen und keine unbekannten Proben sind.
- Für Proben, die sich mit den Negativkontrollen zusammengehäuft haben, gilt möglicherweise Folgendes:
  – sie enthalten keine DNA
  – sie enthalten PCR-Inhibitoren
  – sie sind homozygot für eine Sequenzdeletion
- Bestätigen Sie die Ergebnisse der Proben, die nicht eng zusammengehäuft oder mit Negativkontrollen zusammengehäuft sind, in dem Sie sie erneut testen.
- Sollten Sie Replikate Ihrer Reaktion getestet haben, prüfen Sie Ihren Datensatz sorgfältig auf Ausreißerwerte, um die Richtigkeit der Genotypbestimmungen sicherzustellen. Falls Ausreißer vorhanden sind, bestätigen Sie die Ergebnisse der dazugehörigen Proben, indem Sie sie erneut testen.
- Beobachten Sie die Anzahl der Cluster in der Darstellung. Wenn die Alleldiskriminierungs-Darstellung weniger als drei repräsentative Genotyp-Cluster (heterozyot, homozygot Allel 1 und homozygot Allel 2) enthält, kann die StepOne™-Software die Proben möglicherweise nicht genotypisieren, bis Sie die Funktion 2-Cluster Calling aktivieren.

  Falls die Darstellung weniger als drei Cluster enthält:

  a. Klicken Sie auf **Analysis Settings** (Auswertungseinstellungen).
  b. Klicken Sie auf **Edit Default SNP Assay Settings** (Standard-SNP-Einstellungen bearbeiten).
  c. Wählen Sie **2-Cluster Calling Enabled** (2-Cluster-Bestimmung aktiviert) und anschließend auf **Save Changes** (Änderungen speichern).
  d. Klicken Sie auf **Apply Analysis Settings** (Auswertungseinstellungen anwenden).
  e. Klicken Sie auf **Reanalyze** (Neu auswerten), um die Analyse mithilfe der 2-Cluster-Bestimmung neu auszuwerten.

Hinweis: Die Ergebnisanzeigen sind synchronisiert. Die Auswahl eines Wells in der Plattenbelegung wählt beispielsweise die entsprechenden Daten in der Well-Tabelle und in der Alleldiskriminierungs-Darstellung aus.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Alleldiskriminierungs-Darstellung finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Hinweise

Ansicht der Plattenbelegung

Prüfen Sie die Analyseergebnisse in der Plattenbelegung. Die Plattenbelegung zeigt die Assay-spezifische Einrichtung und Auswertungseigenschaften für die Analyse in einem Well-Format an, das dem für den Lauf verwendeten Reaktionsplattentyp entspricht.

Informationen zu den Beispieldaten

Überzeugen Sie sich, dass die StepOne™-Software für die Bespielanalyse folgende Bestimmungen vorgenommen hat:

- 6 Proben als Allel 1 homozygot (●)
- 4 Proben als Allel 2 homozygot (●)
- 12 Proben als heterozygot (●)
- 2 Proben als Negativkontrollen (■)

Bestätigen Sie, dass keine Wells der Reaktionsplatte QC-Markierungen ausgelõst haben.

Belegung ansehen

1. Klicken Sie auf das Symbol ‹ neben der Alleldiskriminierungsdarstellung, um die Plattenbelegung als Vollbild anzeigen zu lassen.
2. Klicken Sie auf **Show in Wells** (In Wells anzeigen), und aktivieren bzw. deaktivieren Sie anschließend einen Parameter, den die Wells anzeigen sollen.
3. Wiederholen Sie Schritt 2 bis die Plattenbelegung alle gewünschten Parameter enthält.

Parameter	Beschreibung
Probenname	Der Name der Probe, die in den Well eingefüllt wurde.
Aufgabe	Die dem Well zugeordnete Aufgabe: • U - Unbekannte Probe • N - Negativkontrolle • P - Positivkontrolle
SNP-Assay-Name	Der Name des SNPs, der im Well beurteilt wird.
Assay ID	Die Assay-Identifikationsnummer des SNPs, der im Well beurteilt wird.
Allele 1 / Allele 2	Der Name des dazugehörigen Allels des im Well beurteilten SNPs
Allele 1 Dyes / Allele 2 Dyes	Der Name der Reporter- und Quencher-Farbstoffe des Allels, das zu dem im Well beurteilten SNP gehört.
SNP Assay Color	Die Farbe des SNPs, der im Well beurteilt wird.
Sample Color / Task Color	Die Farbe der Probe oder Aufgabe, die dem Well zugewiesen wurde.

Hinweise

Parameter	Beschreibung
Genotype Call	Die der Probe zugewiesene Allelbestimmung: • Homozygot 1/1 • Homozygot 2/1 • Heterozygot 1/2 • ■ Negativkontrolle • ✕ Unbestimmt
Markierung	Die Anzahl der Markierungen, die wie unter dem ▲-Symbol aufgelistet ausgelöst wurden.

In der folgenden Abbildung ist die Plattenbelegung für die Genotypisierungs-Beispielanalyse dargestellt.

Auswertungs-hinweise

Beachten Sie bei der Auswertung Ihrer eigenen Analyse Folgendes:

- In der Plattenbelegung werden vom Benutzer ausgelassene Wells oben links mit ☒ angezeigt und Wells, die durch die QC-Markierungseinstellungen ausgelassen wurden, werden mit ☐ in der Ecke angezeigt.
- Achten Sie darauf, an welcher Stelle eine Probe QC-Markierungen (▲) auslöst. Das Wissen über die Position von Fehlern kann bei der Diagnose von eventuell auftretenden Ausfällen hilfreich sein.

Hinweise

- Sie können die gesamte Reaktionsplatte, Bereiche der Reaktionsplatte oder bestimmte Wells auswählen.
  - Klicken Sie auf die linke obere Ecke der Reaktionsplatte, um alle 48 Wells auszuwählen.
  - Klicken Sie mit der linken Maustaste und ziehen Sie die Maus über einen Bereich, um diesen auszuwählen.
  - Wählen Sie **Sample** (Probe), **Target** (Zielsequenz) oder **Task** (Aufgabe) aus dem Menü Select Items (Artikel auswählen) unter dem Reiter View Plate (Platte anzeigen). Wählen Sie nun Probe, Zielsequenz oder Aufgabennamen aus dem zweiten Select Items-Menü, um Wells eines bestimmten Typs mithilfe des Well-Auswahl-Tools auszuwählen.
- Sie können die Plattenbelegung anpassen:
  - Über die Schaltflächen (Einblenden), (Ausblenden) und (Alle einblenden) können Sie die Anzahl der angezeigten Wells erhöhen bzw. verringern.
  - Mithilfe der Pfeiltasten können Sie die Plattenbelegungsansicht so erweitern, das sie den gesamten Bildschirm bedeckt.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Plattenbelegung finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Ansicht der Well-Tabelle

Prüfen Sie die Einzelheiten der Analyseergebnisse in der Well-Tabelle und identifizieren Sie markierte Wells. Die Well-Tabelle zeigt die Assay-spezifischen Einrichtungs- und Auswertungseigenschaften für die Analyse im Tabellenformat an.

Informationen zu den Beispiel-daten

Bestätigen Sie für die Beispielanalyse, dass keine Wells der Reaktionsplatte QC-Markierungen ausgelöst haben.

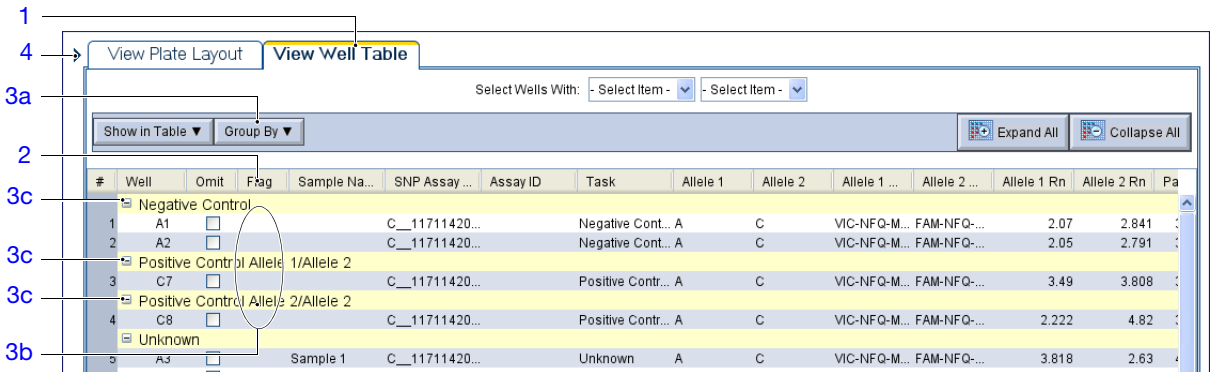
Tabelle prüfen

1. Wählen Sie den Reiter **View Well Table** (Well-Tabelle ansehen).
2. Klicken Sie auf die Spalte **Flag** (Markierung), um die Daten so zu sortieren, dass ausgelöste Markierungen in der Tabelle oben angezeigt werden.
3. Bestätigen Sie die Integrität der Kontrollen:
   a. Wählen Sie aus dem Menü Group By (Gruppieren nach) **Task** (Aufgabe), um die Tabellenzeilen nach ihrer Funktion auf der Reaktionsplatte zu organisieren.
   b. Bestätigen Sie, dass keine der Kontrollen Markierungen ( ) aufweisen.
   c. Klicken Sie auf die Symbole –, um die Negativ- und Positivkontrollen anzuzeigen bzw. auszublenden.

Hinweise

4. Klicken Sie auf > neben dem Reiter View Well Table (Well-Tabelle ansehen), um die Alleldiskriminierungs-Darstellung und die Well-Tabelle gleichzeitig anzeigen zu lassen.

   In der Abbildung unten ist die Well-Tabelle für die Genotypisierungs-Beispielanalyse dargestellt.


1
4
3a
2
3c
3c
3c
3b
View Plate Layout
View Well Table
Select Wells With:
- Select Item -
- Select Item -
Show in Table ▼
Group By ▼
Expand All
Collapse All
Well Omit Flag Sample Na... SNP Assay ... Assay ID Task Allele 1 Allele 2 Allele 1 ... Allele 2 ... Allele 1 Rn Allele 2 Rn
Negative Control
1 A1 C__11711420... Negative Cont... A C VIC-NFQ-M... FAM-NFQ-... 2.07 2.841
2 A2 C__11711420... Negative Cont... A C VIC-NFQ-M... FAM-NFQ-... 2.05 2.791
Positive Control Allele 1/Allele 2
3 C7 C__11711420... Positive Contr... A C VIC-NFQ-M... FAM-NFQ-... 3.49 3.808
Positive Control Allele 2/Allele 2
4 C8 C__11711420... Positive Contr... A C VIC-NFQ-M... FAM-NFQ-... 2.222 4.82
Unknown
5 A3 Sample 1 C__11711420... Unknown A C VIC-NFQ-M... FAM-NFQ-... 3.818 2.63

Spalte	Beschreibung
Well	Die Position des Wells auf der Reaktionsplatte.
Omit	Ein Häkchen zeigt an, dass der Well aus der Auswertung ausgenommen wurde.
Flag	Ein ⚠ signalisiert, dass der Well die Anzahl cvn Markierungenn ausgelöst hat, die innerhalb des Symbols aufgelistet ist.
Sample Name	Der Name der Probe.
SNP Assay Name	Der Name des SNP-Assays, das im Well beurteilt wird.
Assay ID	Die Assay-Identifikationsnummer des SNPs, der im Well beurteilt wird.
Task	Die dem Well zugewiesene Aufgabe (Unbekannt, Negativkontrolle oder Positivkontrolle).
Allele 1 / 2	Der Name des mit dem SNP assoziierten Allels, das im Well beurteilt wird.
Allele 1 / 2 Dyes	Der Name der Reporter- und Quencher-Farbstoffe des mit dem SNP assoziierten Allels, das im Well beurtelt wird.
Allele 1 / 2 R_n	Normalisiertes Signal (R_n) des Reporterfarbstoffs des mit dem SNP assoziierten Allels, das im Well beurteilt wird.
Pass Ref	Das Signal des passiven Referenzfarbstoffs für den Well.
Call	Die Allelbestimmung, die der Probe zugewiesen wird. Mögliche Bestimmungen lauten: • ● Homozygot 1/1 - Homozygot für Allel 1 • ● Homozygot 2/2 - Homozygot für Allel 2 • Heterozygot 1/2 - Heterozygot • ■ Negativkontrolle • X Unbestimmt
Quality(%)	Der für die Genotypenbestimmung errechnete Qualitätswert.
Method	Die für die Zuweisung der Bestimmung zur Probe verwendete Methode (Auto, falls von der StepOne™-Software zugewiesen oder Manual (manuell), falls die Zuweisung durch einen Benutzer erfolgt).

Hinweise

Spalte	Beschreibung
Comments	Kommentare, die für den dazugehörigen Proben-Well eingegeben wurden.
Allele 1 / 2 C_T	Schwellenwertzyklus (C_T) der Probe für das mit dem SNP assoziierte Allel, das im Well beurteilt wird.
QC-Markierungsspalten Die Well-Tabelle zeigt in Spalten QC-Markierungen an, die von den Analysedaten ausgelöst wurden. Wenn die Analysedaten keine QC-Markierungen auslösen, zeigt die StepOne™-Software keine entsprechende Spalte für die Markierungen an. Ein ▲ in einer der folgenden Spalten zeigt an, dass der dazugehörige Well die Markierung ausgelöst hat.	
BADROX	Der Well erzeugte ein passives Referenzsignal, das über dem in den Auswertungseinstellungen festgelegten Grenzwert lag.
OFFSCALE	Der Well erzeugte ein höheres Fluoreszenzniveau, als das StepOne™-System messen konnte.
NOSIGNAL	Der Well erzeugte kein erkennbares Fluoreszenzsignal.
CLUSTER#	Die Anzahl der durch die Analysedaten erzeugten Cluster ist größer als der in den Auswertungseinstellungen definierte Grenzwert für den im Well beurteilten SNP.
PCFAIL	Die Positivkontrolle erzeugt kein R_n für das dazugehörige Allel, das über dem in den Auswertungseinstellungen definiertem Grenzwert lag. Dies weist darauf hin, dass die Amplifikation der Kontrolle möglicherweise fehlgeschlagen ist.
SMCLUSTER	Die Anzahl der Datenpunkte in dem dazugehörigen Cluster liegt unter dem in den Auswertungseinstellungen definierten Grenzwert.
AMPNC	Die Negativkontrolle hat einen R_n erzeugt, der über dem in den Auswertungseinstellungen festgelegten Grenzwert liegt. Dies weist auf eine mögliche Amplifikation hin.
NOAMP	Der Well erzeugte für keines der Allele einen R_n-Wert, der über dem in den Auswertungseinstellungen definiertem Grenzwert lag. Dies weist darauf hin, dass die Amplifikation des Wells möglicherweise fehlgeschlagen ist.
NOISE	Die durch den Well erzeugte Hintergrundfluoreszenz (Rauschen) ist höher als bei anderen Wells auf der Reaktionsplatte, und zwar um einen Faktor, der über dem in den Auswertungseinstellungen definierten Grenzwert liegt.
SPIKE	Die Amplifikationsdarstellung des Well enthält eine oder mehr Datenpunkte, die mit anderen Punkten der Darstellung nicht konsistent sind.
EXPFAIL	Die Software kann den Exponentialbereich der Amplifikationsdarstellung für den Well nicht erkennen.
BLFAIL	Die Software kann die bestmögliche Grundlinie für die Daten des Wells nicht berechnen.
THOLDFAIL	Die Software kann keinen Schwellenwert für den dazugehörigen Well berechnen.
CTFAIL	Die Software kann keinen Schwellenwertzyklus (C_T) für den dazugehörigen Well berechnen.

Auswertungshinweise

Beachten Sie bei der Auswertung Ihrer eigenen Analyse Folgendes:

- Wenn Sie Positivkontrollen verwenden, bestätigen Sie auch die Integrität der Positivkontrollen.

  a. Wählen Sie aus dem Menü Group By (Gruppieren nach) **Task** (Aufgabe), um die Tabellenzeilen nach ihrer Funktion auf der Reaktionsplatte zu organisieren.

Hinweise

b. Bestätigen Sie, dass die Positivkontrollen keine Markierungen aufweisen (▲) und dass ihre normalisierte Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs (R_n) für den Genotyp geeignet ist (zum Beispiel bei der Beurteilung der Positivkontrolle Allel 1/Allel 1 wäre ein bedeutender Anstieg des R_n-Werts für die Allel 1-Sonde zu erwarten und nur ein sehr geringer für die Allel 2-Sonde).

c. Wiederholen Sie Schritt b für jede Positivkontrolle.

- Prüfen Sie die Daten für die unbekannten Proben. Beachten Sie bei allen Zeilen, die ein ▲ in der Spalte Flag aufweisen, die Daten und die Markierung(en) für den zugehörigen Well.
- Wählen Sie die Bereiche der Tabelle oder Wells eines angegebenen Typs aus, indem Sie wie folgt vorgehen:
  - Klicken Sie mit der linken Maustaste und ziehen Sie die Maus über den Bereich, den Sie als Bereich der Tabelle auswählen möchten.
  - Wählen Sie den Reiter View Table (Tabelle ansehen) und anschließend aus dem Menü Select Items (Artikel auswählen) **Sample** (Probe), **Target** (Zielsequenz) oder **Task** (Aufgabe). Wählen Sie nun auf dem zweiten Select Items-Menü den Proben-, Zielsequenz- oder Aufgabennamen, um Wells eines bestimmten Typs mithilfe des Well-Auswahl-Tools auszuwählen.
- Gruppieren Sie die Zeilen der Plattenbelegung durch Auswahl einer Option aus dem Menü Group By (Gruppieren nach). Anschließend können Sie die Listen ein- oder ausblenden, indem Sie auf das Symbol +/- neben den einzelnen Listen klicken, oder indem Sie auf **Collapse All** (Alle ausblenden) bzw. **Expand All** (Alle einblenden) klicken.
- Um einen Well aus der Auswertung herauszunehmen, aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Omit** für diesen Well. Um den Well in die Auswertung einzubeziehen, deaktivieren Sie das Kontrollkästchen **Omit**.

Hinweis: Sie müssen die Analyse nach jedem Herausnehmen oder Einbeziehen eines Wells neu auswerten.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Well-Tabelle finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Hinweise

Ansicht der QC-Zusammenfassung

Prüfen Sie die Zusammenfassung der QC-Markierungen, die von den Analysedaten ausgelöst wurden, und beheben Sie die gekennzeichneten Fehler. Die Zusammenfassung zur Qualitätskontrolle zeigt die Häufigkeit und den Ort aller QC-Markierungen an. Sollte eine Markierung in einer Analyse nicht auftreten, ist die Häufigkeit gleich 0. Ist die Häufigkeit nicht 0, erscheint die Markierung an der Well-Position, die in der Spalte Location aufgeführt ist. Durch Klicken auf die Markierung werden die Details angezeigt, einschließlich einer Liste aller gekennzeichneten Wells.

Informationen zu den Beispieldaten

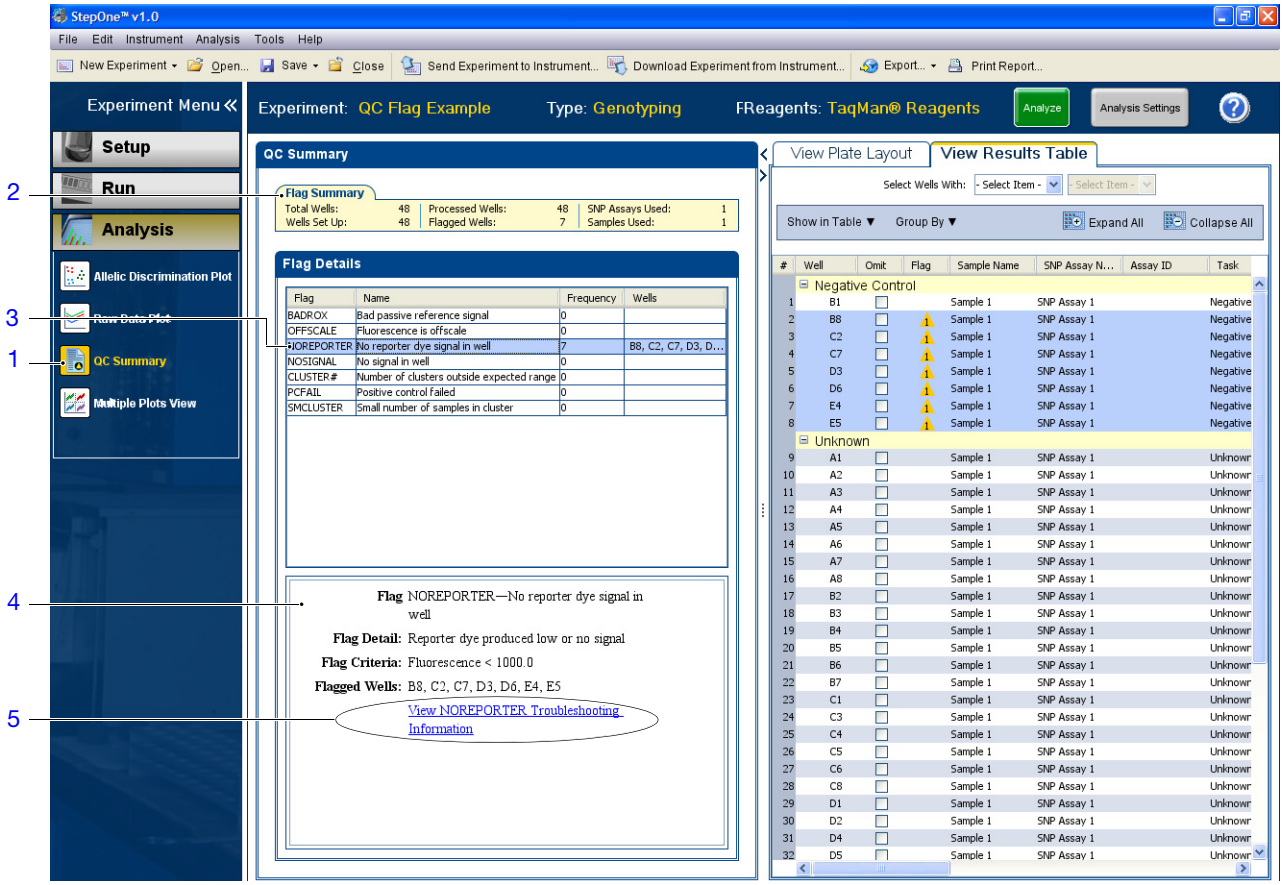
Da die Beispielanalyse keinerlei QC-Markierungen (▲) auslöst, stammt die unten stehende Abbildung aus einer anderen Analyse mit Wells, die die Markierung NOREPORTER auslösten.

Zusammenfassung prüfen

1. Wählen Sie in der Navigationsleiste **QC Summary** (Zusammenfassung der Qualitätskontrolle) aus.
2. Prüfen Sie die Zusammenfassung und achten Sie dabei auf die Anzahl der Wells, die eine Markierung auslösten.
3. Wählen Sie in der Zusammenfassung Flag Details (Markierungsdetails) die Markierung **NOREPORTER** aus.
4. Prüfen Sie die detaillierten Informationen, die für NOREPORTER angezeigt werden.
5. Klicken Sie auf **View NOREPORTER Troubleshooting Information**, um die Informationen zur Fehlerbehebung für diese Markierungen darzustellen.

In der Abbildung unten wird eine Zusammenfassung zur Qualitätskontrolle für eine Genotypisierungsanalyse mit Markierungen dargestellt.

Hinweise



Auswertungshinweise

Beachten Sie bei der Auswertung Ihrer eigenen Analyse Folgendes:

- Wählen Sie jede QC-Markierung in der Ansicht Flag Details (Markierungsdetails) mit einer Häufigkeit von über 0 aus, prüfen Sie Häufigkeit und Ort der Wells, die die Markierung ausgelöst haben, und klicken Sie anschließend auf den Link zur Fehlerbehebung für die Markierung.

Hinweis: Wenn Sie eine Markierung aus der Tabelle Flag Details auswählen, werden die Wells, die die Markierung auslösten, in der Well-Tabelle hervorgehoben.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zu QC-Markierungen finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

5

Hinweise

Ansicht der Rohdatendarstellung

Prüfen Sie, sofern erforderlich, die Rohdatendarstellung auf Unregelmäßigkeiten in den vom StepOne™-System gesammelten Rohspektren.

Die Rohdatendarstellung zeigt die Amplitude der Rohfluoreszenz an, die in jedem Kanal (1 bis 3) während dem Laufzyklus generiert wurde, den der „Show Cycle“-Regler anzeigt. Die Darstellung zeigt die Rohspektren für die in der Plattenbelegung bzw. in der Well-Tabelle ausgewählten Wells an.

Informationen zu den Beispieldaten

In der Beispielanalyse prüfen Sie die Rohdatendarstellung auf einen stabilen Signalanstieg (keine abrupten Änderungen oder Einbrüche) für den geeigneten Filter.

Darstellung prüfen

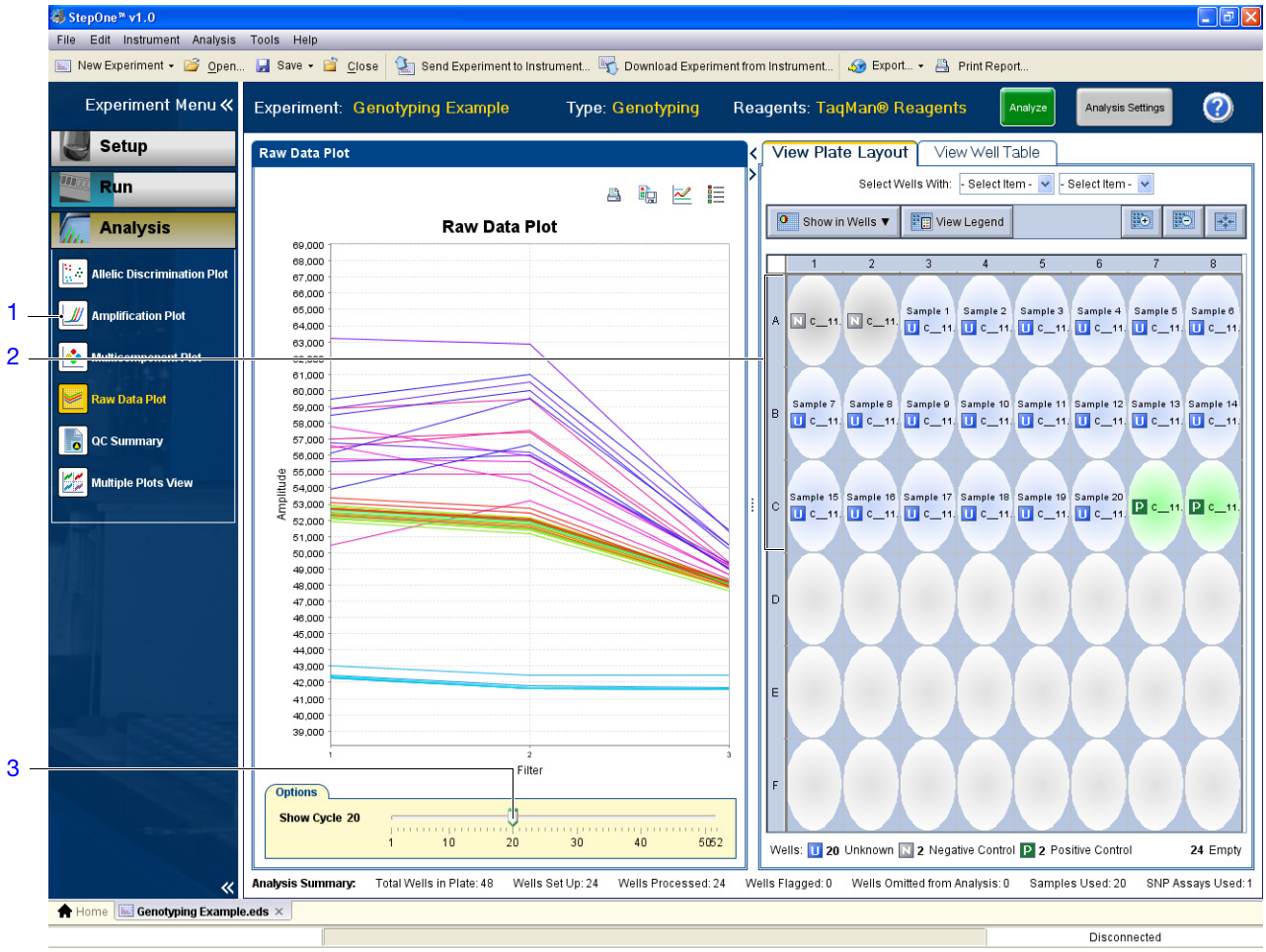
1. Wählen Sie im Navigationsbereich **Raw Data Plot**.
2. Wählen Sie in der Well-Tabelle die zu untersuchenden Wells aus.
3. Ziehen Sie den Show Cycle (Zyklus anzeigen)-Regler, um temporäre Änderungen in jedem Filter des Rohdatenprofils anzeigen zu lassen.

   Das StepOne-System verfügt über die folgenden Filter:

Filter	1	2	3
Farbstoff	• FAM™-Farbstoff • SYBR® Green-Farbstoff	• JOE™-Farbstoff • VIC®-Farbstoff	• ROX™-Farbstoff

Hinweise

In der Abbildung unten sind Rohdaten aus der Beispielanalyse für die Genotypisierung dargestellt.



Auswertungshinweise

Achten Sie bei der Auswertung Ihrer eigenen Analyse bei jedem Filter auf Folgendes:

- charakteristischer Signalanstieg
- keine abrupten Änderungen oder Einbrüche

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Rohdatendarstellung finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Hinweise

Ansicht der Multikomponentendarstellung

In der Multikomponentendarstellung wird der vollständige spektrale Beitrag eines jeden Farbstoffs in einem ausgewählten Well über die Dauer des PCR-Laufs angezeigt.

Informationen zu den Beispieldaten

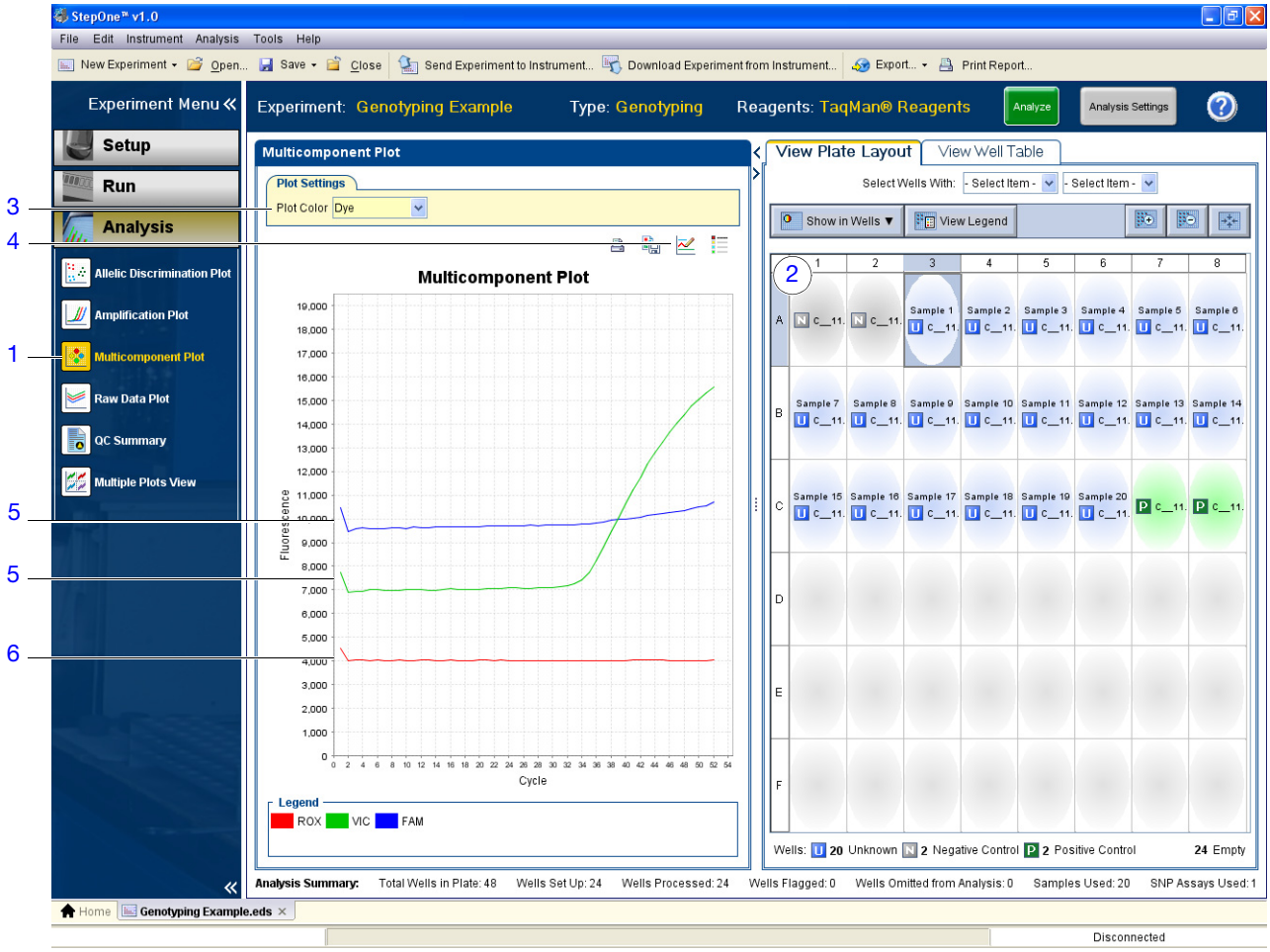
Prüfen Sie in der Beispielanalyse die Multikomponentendarstellung auf Folgendes:

- ROX™-Farbstoff (passive Referenz)
- FAM™-Farbstoff (Reporter)
- Spitzen, Tiefen und/oder plötzliche Änderungen
- Amplifikation in den Negativkontroll-Wells

Ansicht der Multikomponentendarstellung

1. Wählen Sie in der Navigationsleiste **Multicomponent Plot** aus.
2. Wählen Sie ein Well aus der Plattenbelegung aus. Es wird in der Multikomponentendarstellung angezeigt.
3. Wählen Sie aus dem Dropdown-Menü Plot Color (Darstellungsfarbe) **Dye** (Farbe).
4. Klicken Sie auf **Show/Hide the plot legend** (Darstellungslegende anzeigen/ausblenden).
5. Prüfen Sie die FAM™- und VIC®-Farbsignale. In der Beispielanalyse steigen die FAM™- und VIC®-Farbsignale über die gesamte PCR hinweg an, was auf eine normale Amplifikation hindeutet.
6. Prüfen Sie das ROX®-Farbsignal. In der Beispielanalyse bleibt das ROX-Farbsignal während des gesamten PCR-Verfahrens konstant, was auf typische Daten hinweist.
7. Wählen Sie die Negativkontoll-Wells nacheinander aus und prüfen Sie auf Amplifikation. In der Beispielanalyse gibt es in den Negativkontroll-Wells keine Amplifikation.

Hinweise



Auswertungshinweise

Beachten Sie bei der Auswertung Ihrer eigenen Analyse Folgendes:

- Passive Referenz: Das Fluoreszenzniveau der passiven Referenz sollte während des gesamten PCR-Verfahrens relativ konstant bleiben.
- Reporter-Farbe: Das Fluoreszenzniveau der Reporter-Farbe sollte einen flachen Bereich für die Grundlinie, gefolgt von einem rapiden Anstieg der Fluoreszenz im Verlauf der Amplifikation aufweisen.
- Unregelmäßigkeiten im Signal: Es sollten keine Spitzen, Tiefen und/oder plötzlichen Änderungen im Fluoreszenzsignal auftreten.
- Negativkontroll-Wells: Es sollten keine Amplifikationen in den Negativkontroll-Wells auftreten.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Multikomponentendarstellung finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

5

Hinweise

Ansicht der Amplifikationsdarstellung

Falls Sie für Ihre Analyse Echtzeitdaten erfasst haben, prüfen Sie die Amplifikationsdaten, um die von den Analysedaten ausgelösten Markierungen besser zu verstehen.

Auf dem Bildschirm Amplification Plot (Amplifikationsdarstellung) wird die Amplifikation aller Proben in den ausgewählten Wells angezeigt. Verwenden Sie die Amplifikationsdarstellungen, um die Ergebnisse der Analyse zu bestätigen:

- **ΔRn über dem Zyklus**: ΔR_n ist die Intensität des während des PCR-Laufs generierten normalisierten Fluoreszenzsignals; daraus wird der C_T berechnet. Diese Darstellung zeigt ΔR_n als Funktion der Zyklusanzahl. Sie können diese Darstellung dazu verwenden, eine unregelmäßige Amplifikation zu erkennen und zu überprüfen und sich die Werte für Schwellenwert und Grundlinie anzusehen.
- **Rn über dem Zyklus**: R_n ist die normalisierte Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs. Diese Darstellung zeigt R_n als Funktion der Zyklusanzahl. Sie können diese Darstellung dazu verwenden, eine unregelmäßige Amplifikation zu erkennen und zu überprüfen.
- **C_T über den Wells**: Der Schwellenwert-Zyklus (C_T) ist der PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzniveau den Schwellenwert überschreitet. Diese Darstellung zeigt C_T als Funktion der Well-Position. Sie können diese Darstellung dazu verwenden, eine extreme Amplifikation (Ausreißer) zu lokalisieren.

Jede Darstellung kann in Form eines der folgenden Graphentypen betrachtet werden: linear oder log10.

Hinweis: Weitere Informationen zu Amplifikationsdarstellungen finden Sie im *Real-Time PCR Systems Chemistry Guide* oder in der *StepOne™ Software Help*.

Informationen zu den Beispieldaten

Prüfen Sie in der Beispielanalyse die Amplifikationsdarstellung auf Folgendes:

- korrekte Werte für Grundlinie und Schwellenwert
- Ausreißer

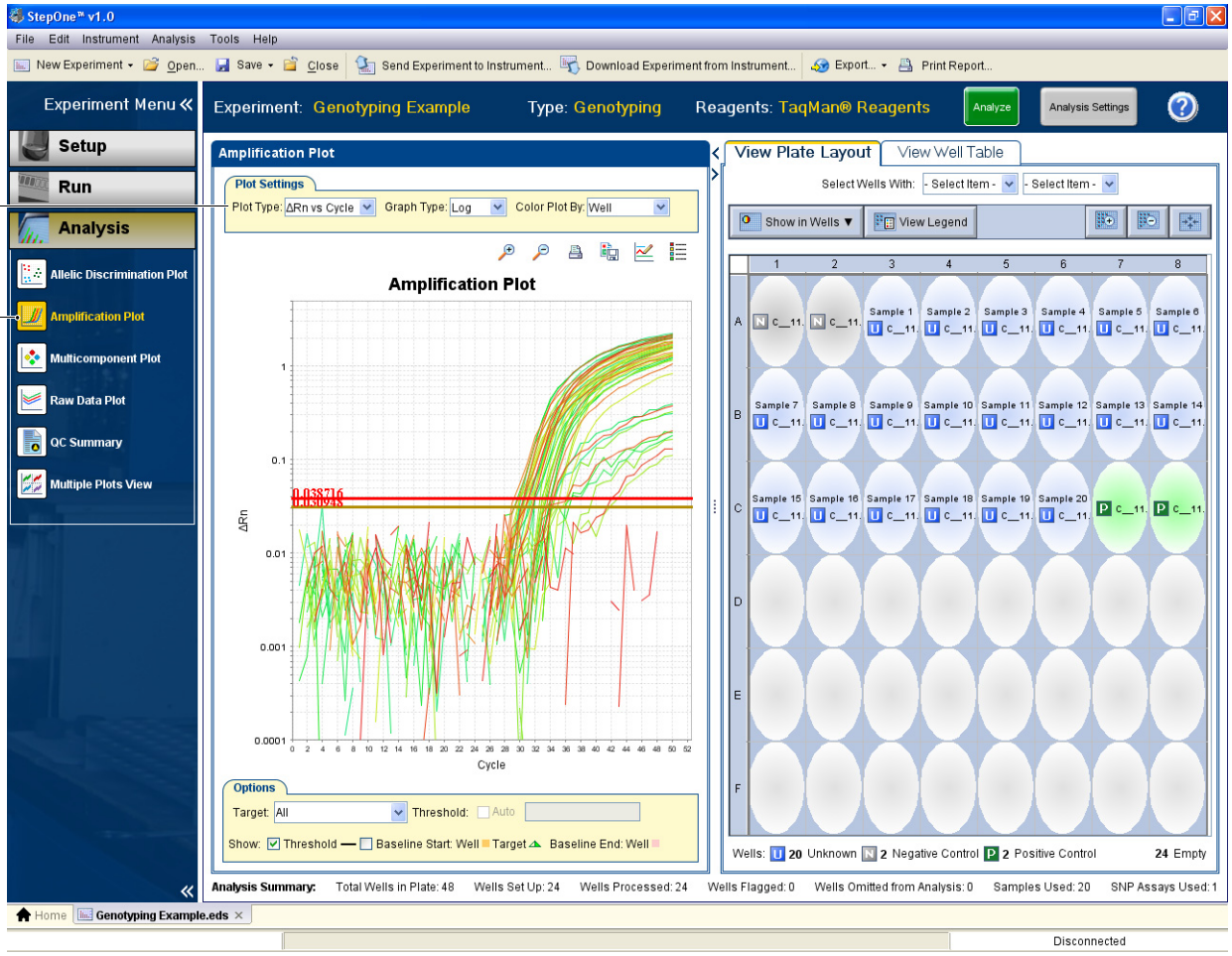
Ergebnisse prüfen

1. Wählen Sie in der Navigationsleiste **Amplification Plot** aus.
2. In der Amplifikationsdarstellung:
   a. Wählen Sie aus dem Dropdown-Menü Plot Type (Darstellungstyp) **ΔRn vs Cycle** (Rn über dem Zyklus).
   b. Wählen Sie aus dem Dropdown-Menü Color Plot By (Darstellungsfarbe entsprechend) **Well**.
   c. Klicken Sie auf **Show/Hide the plot legend** (Darstellungslegende anzeigen/ausblenden).

Hinweise

3. Sehen Sie sich die Grundlinienwerte an:
   a. Wählen Sie aus dem Dropdown-Menü Graph Type (Graphentyp) **Linear**.
   b. Wählen Sie **Baseline** (Grundlinie), um den Start- und Endzyklus anzuzeigen.
   c. Prüfen Sie, dass die Grundlinie korrekt eingestellt ist.
4. Sehen Sie sich die Schwellenwerte an:
   a. Wählen Sie aus dem Dropdown-Menü Graph Type (Graphentyp) **Log**.
   b. Wählen Sie aus dem Dropdown-Menü Target (Zielsequenz) **C__11711420_30-A**.
   c. Wählen Sie **Threshold** (Schwellenwert), um den Schwellenwert anzuzeigen.
   d. Prüfen Sie, dass der Schwellenwert korrekt eingestellt ist. In der Beispielanalyse liegt der Schwellenwert in der exponentiellen Phase.
5. Stellen Sie eventuelle Ausreißer fest:
   a. Wählen Sie aus dem Dropdown-Menü Plot Type (Darstellungstyp) **C_T vs Well** (C_T über dem Wells).
   b. Bestätigen Sie, dass die Replikat-Wells eine ähnliche Amplifikation erreicht haben. In der Beispielanalyse werden keine Replikat-Wells verwendet.

Hinweise

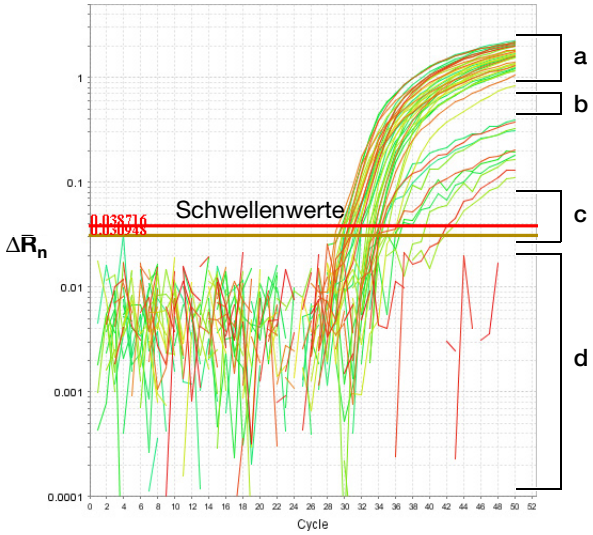


Auswertungshinweise

Beachten Sie bei der Auswertung Ihrer eigenen Analyse Folgendes:

- Korrekte Werte für Grundlinie und Schwellenwert: StepOne™-Software berechnet die Werte für Grundlinie und Schwellenwert automatisch auf Grundlage der Annahme, dass die Daten eine *typische* Amplifikationskurve zeigen. Eine typische Amplifikationskurve weist Folgendes auf:
  - Plateauphase (a)
  - lineare Phase (b)
  - exponentielle (geometrische) Phase (c)
  - Hintergrund (d)
  - Grundlinie (nicht angezeigt - Grundwerte werden für jede Kurve individuell berechnet)

Hinweise



WICHTIG! Versuchsfehler (wie Kontaminationen oder Pipettierfehler) können atypische Amplifikationskurven verursachen, die zu falschen Berechnungen von Grundlinie und Schwellenwert durch die StepOne™-Software führen können. Aus diesen Gründen empfiehlt Applied Biosystems, dass Sie sich nach Abschluss der Auswertung die Amplifikationsdarstellung ansehen und die zugewiesenen Werte für Grundlinie und Schwellenwert für jeden Well überprüfen. Weitere Informationen finden Sie in der *StepOne™ Software Help*.

- Ausreißer

Wenn Ihre Analyse die oben genannten Hinweise nicht erfüllt, beheben Sie den Fehler wie folgt:

- Berichtigen Sie die Grundlinie und/oder den Schwellenwert manuell (siehe *StepOne™ Software Help*)

  oder

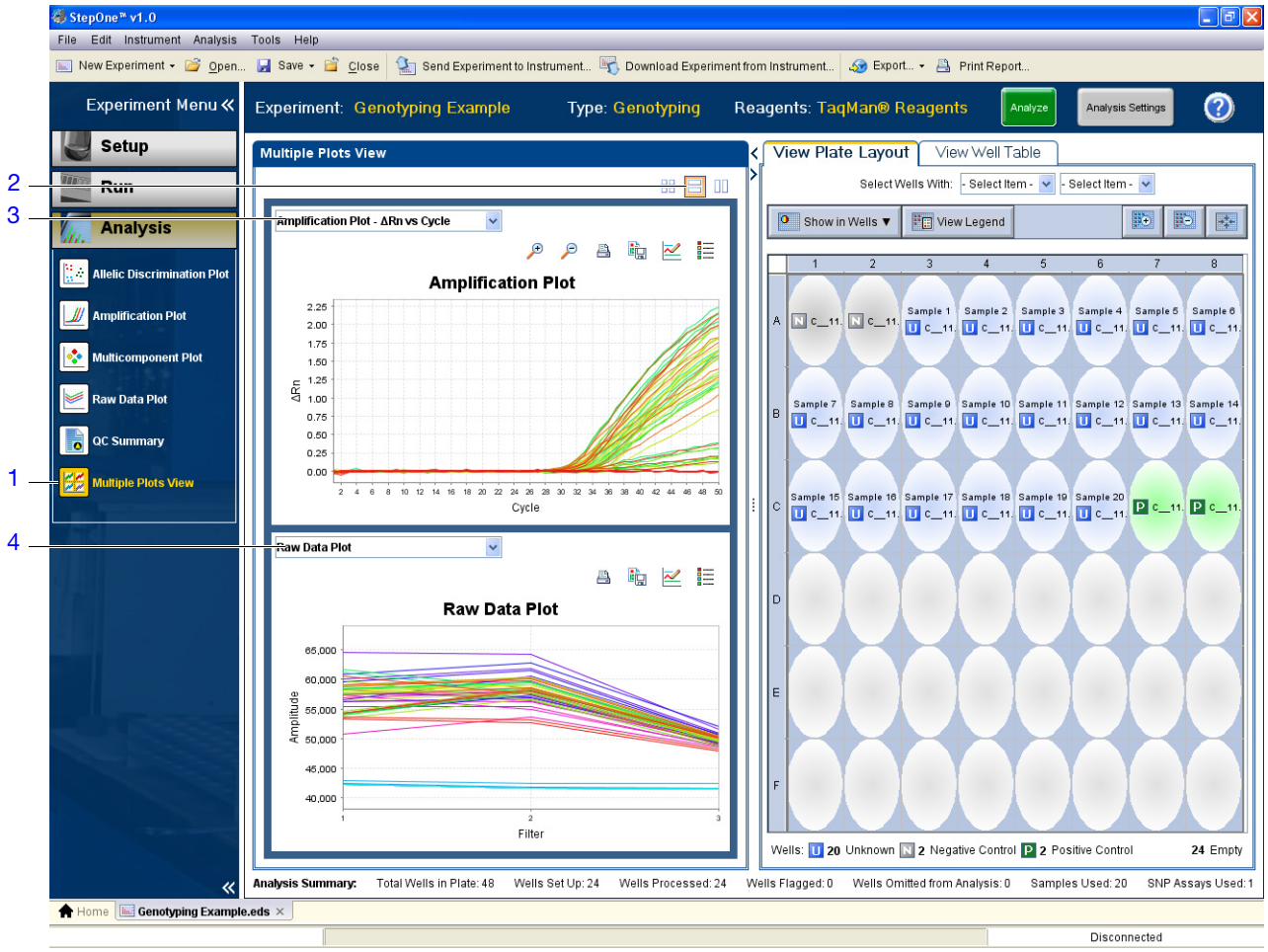
- Nehmen Sie einen Well aus, indem Sie in der Plattenbelegung rechts klicken und **Omit** (Ausnehmen) wählen.

So zeigen Sie mehrere Darstellungen gleichzeitig an

Über die Ansicht „Multiple Plots View“ können bis zu vier Darstellungen gleichzeitig ausgewertet werden. Sie können jede Darstellung einzeln, zwei Darstellungen als Zeilen oder Spalten oder alle in einer 2 × 2-Matrix anzeigen lassen.

So prüfen Sie die Ergebnisse in mehreren Darstellungen:

1. Wählen Sie in der Navigationsleiste **Multiple Plots View** aus.
2. Klicken Sie auf , um zwei Darstellungen parallel anzeigen zu lassen.
3. Wählen Sie in der oberen Darstellung **Amplification Plot (ΔR_n vs. Cycle)**, um die Ergebnisse des Amplifikationslaufs für jeden in der Plattenbelegung ausgewählten Well anzeigen zu lassen.
4. Wählen Sie in der unteren Darstellung **Raw Data Plot** (Rohdatendarstellung), um die Rohdaten für jeden in der Plattenbelegung ausgewählten Well anzeigen zu lassen.



Hinweise

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Amplifikationsdarstellung oder zur Anzeige von mehrerenPlots finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Ansicht der Auswertungseinstellungen

Falls Sie mit der Art der Bestimmung von Genotypen oder den Schwellenwerten der QC-Markierungen der StepOne™-Software nicht zufrieden sind, prüfen und ändern Sie die Auswertungseinstellungen und/oder Bestimmungen (Calls) nach Bedarf.

Informationen zu den Beispiel-daten

In der Beispielanalyse können Sie die Auswertungseinstellungen prüfen und nach Bedarf anpassen und erfahren so, wie die Bestimmungs-, C_T und Markierungseinstellungen zur Auswertung der Genoptypisierungsdaten beitragen.

Auswertungs-einstellungen ändern

1. Klicken Sie in der Analyse auf **Analysis Settings** (Auswertungseinstellungen).
2. Wählen Sie aus der Tabelle Select a SNP Assay (SNP-Assay auswählen) **C__11711420_30**.
3. Klicken Sie auf **Edit Default Settings** (Standardeinstellungen bearbeiten).
4. Falls Sie manuelle Bestimmungen vorgenommen haben, wählen Sie im Dialogfeld Edit Default SNP Assay Settings (Standard-SNP-Assay-Einstellungen bearbeiten) **Keep Manual Calls from Previous Analysis** (Manuelle Bestimmungen aus der vorherigen Auswertung übernehmen).
5. Geben Sie im Feld Quality Value (Qualitätswert) einen Prozentwert ein, der als Qualitätsintervall für Autocalling-Proben gilt. Je höher der Wert, desto strikter die Allelbestimmung.
6. Klicken Sie auf **Save Changes** (Änderungen speichern), um die Einstellungen zu speichern.
7. Passen Sie die C_T-Einstellungen an:
   a. Wählen Sie den Reiter **Ct Settings** (C_T-Einstellungen).
   b. Wählen Sie aus der Tabelle zur Auswahl der Allele Allel **A** und deaktivieren Sie die Option **Use Default Settings** (Standardeinstellungen verwenden).
   c. Deaktivieren Sie **Automatic Threshold** (Automatischer Schwellenwert) und geben Sie einen neuen Schwellenwert ein.
   d. Deaktivieren Sie **Automatic Baseline** (Automatischer Grundlinienwert) und geben Sie einen neuen Grundlinienwert ein.
   e. Wiederholen Sie die Schritte 7b bis 7d für Allel **C**.

   Hinweis: Weitere Informationen zur Einrichtung der Schwellenwertzyklen für Genotypisierungsläufe finden Sie in der Hilfe der *StepOne™ Software*.

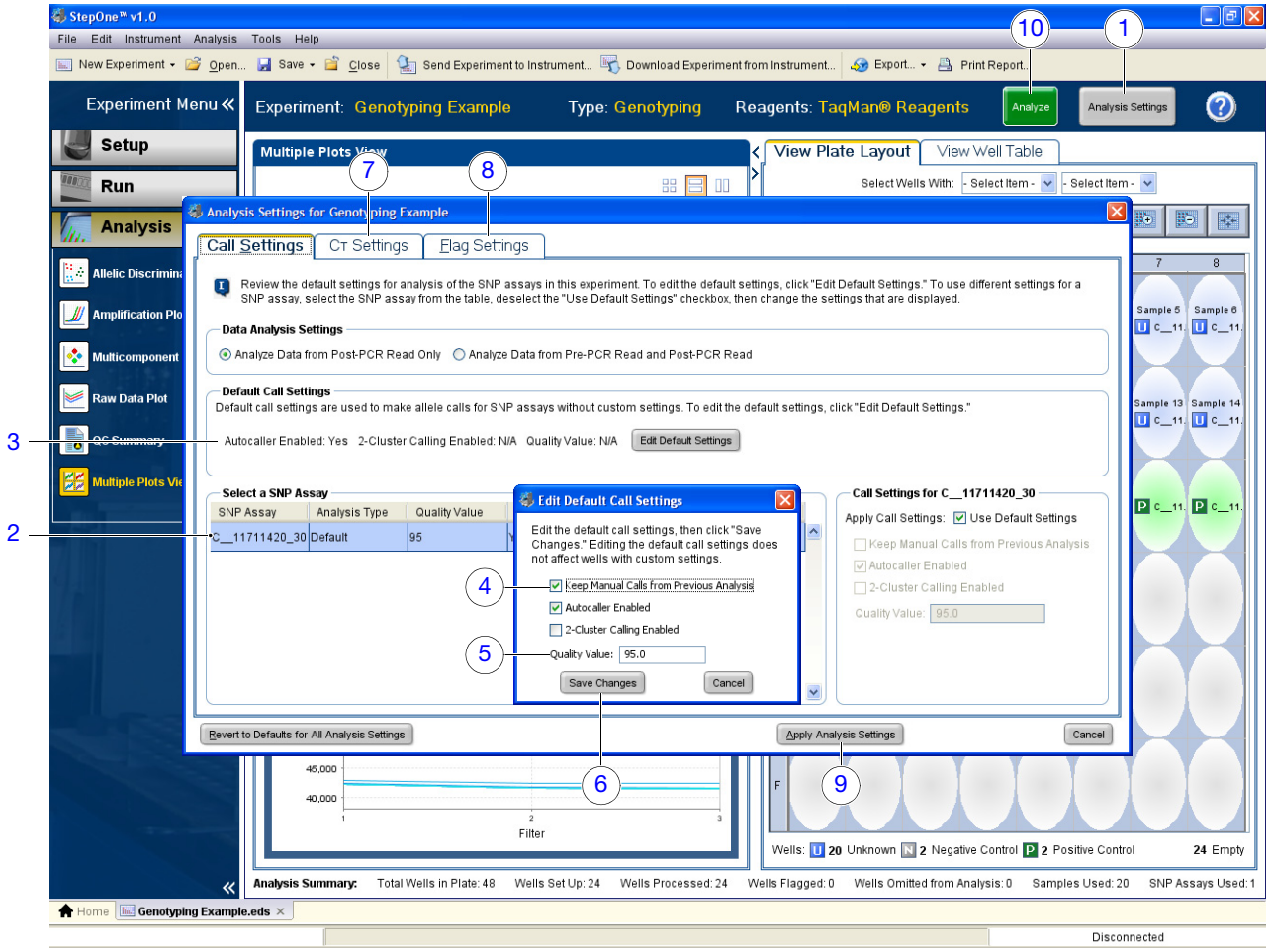
Hinweise

8. Passen Sie die Markierungseinstellungen an:
   a. Wählen Sie den Reiter **Flag Settings** (Markierungseinstellungen).
   b. Aktivieren Sie in der Spalte Use (Verwendung) die Kontrollkästchen aller Markierungen, die Sie aktivieren möchten.
   c. Passen Sie die Werte der aktivierten Markierungen nach Bedarf an.
   d. Falls Sie möchten, dass eine aktivierte QC-Markierung Wells, die für die definierte Bedingung positiv ausfallen, automatisch aus der Analyse herausnehmen soll, aktivieren Sie für diese Markierung das Kontrollkästchen Reject Well (Well ablehnen).

   Hinweis: Mithilfe der QC-Markierungen können Sie Bedingungen kennzeichnen und Wells herausnehmen, sobald bestimmte Kriterien erfüllt sind (zum Beispiel wenn bei einem Well Daten fehlen). Weitere Informationen finden Sie in der *StepOne™ Software Help*.

9. Klicken Sie auf **Apply Analysis Settings** (Auswertungseinstellungen anwenden).
10. Klicken Sie zur Auswertung der Daten anhand der neuen Einstellungen auf **Reanalyze** (Neu auswerten).

In der Abbildung unten sind die Auswertungseinstellungen für die Genotypisierungs-Beispielanalyse dargestellt.


StepOne™ v1.0
File Edit Instrument Analysis Tools Help
New Experiment Open... Save Close Send Experiment to Instrument... Download Experiment from Instrument... Export... Print Report...
Experiment Menu
Experiment: Genotyping Example
Type: Genotyping
Reagents: TaqMan® Reagents
Analyze
Analysis Settings
Setup
Run
Analysis
Multiple Plots View
View Plate Layout
View Well Table
Select Wells With: - Select Item - - Select Item -
Analysis Settings for Genotyping Example
Call Settings
CT Settings
Flag Settings
Review the default settings for analysis of the SNP assays in this experiment. To edit the default settings, click "Edit Default Settings." To use different settings for a SNP assay, select the SNP assay from the table, deselect the "Use Default Settings" checkbox, then change the settings that are displayed.
Data Analysis Settings
Analyze Data from Post-PCR Read Only
Analyze Data from Pre-PCR Read and Post-PCR Read
Default Call Settings
Default call settings are used to make allele calls for SNP assays without custom settings. To edit the default settings, click "Edit Default Settings."
Autocaller Enabled: Yes 2-Cluster Calling Enabled: N/A Quality Value: N/A
Edit Default Settings
Select a SNP Assay
SNP Assay
Analysis Type
Quality Value
C__11711420_30
Default
95
Edit Default Call Settings
Edit the default call settings, then click "Save Changes." Editing the default call settings does not affect wells with custom settings.
Keep Manual Calls from Previous Analysis
Autocaller Enabled
2-Cluster Calling Enabled
Quality Value: 95.0
Save Changes
Cancel
Call Settings for C__11711420_30
Apply Call Settings: Use Default Settings
Keep Manual Calls from Previous Analysis
Autocaller Enabled
2-Cluster Calling Enabled
Quality Value: 95.0
Revert to Defaults for All Analysis Settings
Apply Analysis Settings
Cancel
Filter
Wells: U 20 Unknown N 2 Negative Control P 2 Positive Control 24 Empty
Analysis Summary: Total Wells in Plate: 48 Wells Set Up: 24 Wells Processed: 24 Wells Flagged: 0 Wells Omitted from Analysis: 0 Samples Used: 20 SNP Assays Used: 1
Home
Genotyping Example.eds
Disconnected
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Auswertungshinweise

Beachten Sie bei der Auswertung Ihrer eigenen Analyse Folgendes:

- Wenn Ihre Analyse aus zwei Clustern besteht, aktivieren Sie den Algorithmus für die 2-Cluster -Bestimmung, indem Sie aus dem Dialogfeld Edit Default SNP Assay Settings (Standard-SNP-Assay-Einstellungen bearbeiten) **2-Cluster Calling Enabled** (2-Cluster-Bestimmung aktiviert) wählen.
- Die C_T-Einstellungen stehen nur für Auswertungen zur Verfügung, die Amplifikationsdaten enthalten. Analysen, die nur aus Prä- und Post-PCR-Messungen bestehen, verwenden den Schwellenwertzyklus (C_T) zur Auswertung nicht.
- Probendaten können wie folgt bestimmt werden:
  - automatisch mithilfe des Autocallers (siehe Seite 98)
  - manuell mithilfe der Menüleiste und dem Scatterplot (siehe Seite 99)

Weitere Informationen

Weitere Informationen zu Auswertungseinstellungen finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

5

Hinweise

Bestimmungen automatisch zuweisen

1. Klicken Sie in der Analyse auf **Analysis Settings** (Auswertungseinstellungen).
2. Wählen Sie den gewünschten SNP- Assay aus der Tabelle Select a SNP Assay (SNP-Assay auswählen) aus.
3. Klicken Sie auf **Edit Default SNP Assay Settings** (Standard-SNP-Einstellungen bearbeiten).
4. Falls Sie manuelle Bestimmungen vorgenommen haben, wählen Sie **Keep Manual Calls from Previous Analysis** (Manuelle Bestimmungen aus vorheriger Analyse übernehmen).
5. Wählen Sie zur automatischen Aktivierung der Auswertung **Autocaller Enabled** (Autocaller aktiviert).
6. Falls Sie die Datenauswertung in zwei Clustern erwarten, wählen Sie **2-Cluster Calling Enabled** (2-Cluster-Bestimmung aktivieren).
7. Geben Sie im Feld Quality Value (Qualitätswert) einen Prozentwert ein, der als Qualitätsintervall für Autocalling-Proben gilt. (Je höher der Wert, desto strikter die Allelbestimmung.)
8. Klicken Sie auf **Save Changes** (Änderungen speichern), um die Einstellungen zu speichern.
9. (*Optional*) Weisen Sie Markierungen zu:
   a. Wählen Sie den Reiter **Flag Settings** (Markierungseinstellungen).
   b. Weisen Sie die gewünschten Markierungen zu.

      Hinweis: Bei der Zuweisung von Markierungen können Sie Bedingungen markieren und Wells herausnehmen, sobald bestimmte Kriterien erfüllt sind (zum Beispiel wenn bei einem Well Daten fehlen). Weitere Informationen finden Sie in der *StepOne™ Software Help*.

   c. Klicken Sie zum Schließen des Dialogfelds für die Auswertungseinstellungen auf **Apply Analysis Settings** (Auswertungseinstellungen übernehmen).
10. Klicken Sie zur Auswertung der Daten anhand der neuen Einstellungen auf **Reanalyze** (Neu auswerten).

Bestimmungen manuell zuweisen

1. Klicken Sie in der Analyse auf **Analysis Settings** (Auswertungseinstellungen).
2. Wählen Sie den gewünschten SNP- Assay aus der Tabelle Select a SNP Assay (SNP-Assay auswählen) aus.
3. Richten Sie die Marker-Auswertungseinstellungen ein:
   a. Klicken Sie auf **Edit Default SNP Assay Settings** (Standard-SNP-Einstellungen bearbeiten).
   b. Deaktivieren Sie **Autocaller enabled** (Autocaller aktiviert).
   c. Klicken Sie auf **Save Changes** (Änderungen speichern), um die Einstellungen zu speichern.
4. (*Optional*) Weisen Sie Markierungen zu:
   a. Wählen Sie den Reiter **Flag Settings** (Markierungseinstellungen).
   b. Weisen Sie die gewünschten Markierungen zu.

      Hinweis: Bei der Zuweisung von Markierungen können Sie Bedingungen markieren und Wells herausnehmen, sobald bestimmte Kriterien erfüllt sind (zum Beispiel wenn bei einem Well Daten fehlen). Weitere Informationen finden Sie in der *StepOne™ Software Help*.

   c. Klicken Sie auf **Apply Analysis Settings** (Auswertungseinstellungen anwenden).
5. Klicken Sie zur Auswertung der Daten anhand der neuen Einstellungen auf **Reanalyze** (Neu auswerten).
6. Wählen Sie im Navigationsbereich **Allelic Discrimination Plot**.
7. Wählen Sie aus dem Menü SNP Assay einen Marker aus. In der Alleldiskriminierungsdarstellung werden für die ausgewählten Marker Kreuze (× – Unbestimmt) angezeigt.
8. So weisen Sie einer Probe eine Bestimmung zu:
   a. Klicken Sie auf (Auswahlwerkzeug).
   b. Klicken und ziehen Sie ein Feld um die gewünschten Datenpunkte in der Darstellung.
   c. Aktivieren Sie im Menü Apply Call (Bestimmung übernehmen) die gewünschte Bestimmung.
   d. Wiederholen Sie die Schritte 8b und 8c, um den restlichen Datenpunkten Bestimmungen zuzuweisen.
9. Wenn Sie Bestimmungen für mehrere SNPs zuweisen, wählen Sie einen anderen Marker aus dem SNP Assay-Dropdown-Menü und wiederholen Sie Schritt 8.

Hinweise

Veröffentlichen der Daten

Sie können die Analysedaten auf verschiedene Weise ausgeben lassen:

- Speichern der Darstellung als Bilddatei
- Drucken der Darstellung
- Drucken der Plattenbelegung
- Erstellen von Folien
- Drucken eines Berichts
- Datenexport

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Veröffentlichung von Daten finden Sie in der StepOne™-Software Help, indem Sie auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Hinweise

A

Alternative Analyseabläufe

Dieser Anhang umfasst die folgenden Themen:

- Arbeitsablauf für Setup für Fortgeschrittene 102
- QuickStart-Arbeitsablauf 107
- Verwenden von Vorlagen 112
- Arbeitsablauf für den Export/Import 113

Hinweis: Weitere Informationen über ein Thema dieses Handbuchs finden Sie in der Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software, indem Sie entweder **F1** drücken, in der Symbolleiste auf klicken oder **Help ▸ StepOne Help** (Hilfe ▸ StepOne-Hilfe) wählen.

Hinweise

Setup für Fortgeschrittene

Wenn Sie mit der Nutzung der StepOne™-Software vertraut sind, können Sie die Genotypisierungsanalyse ohne den Analysedesign-Assistenten über das Setup für Fortgeschrittene erstellen.

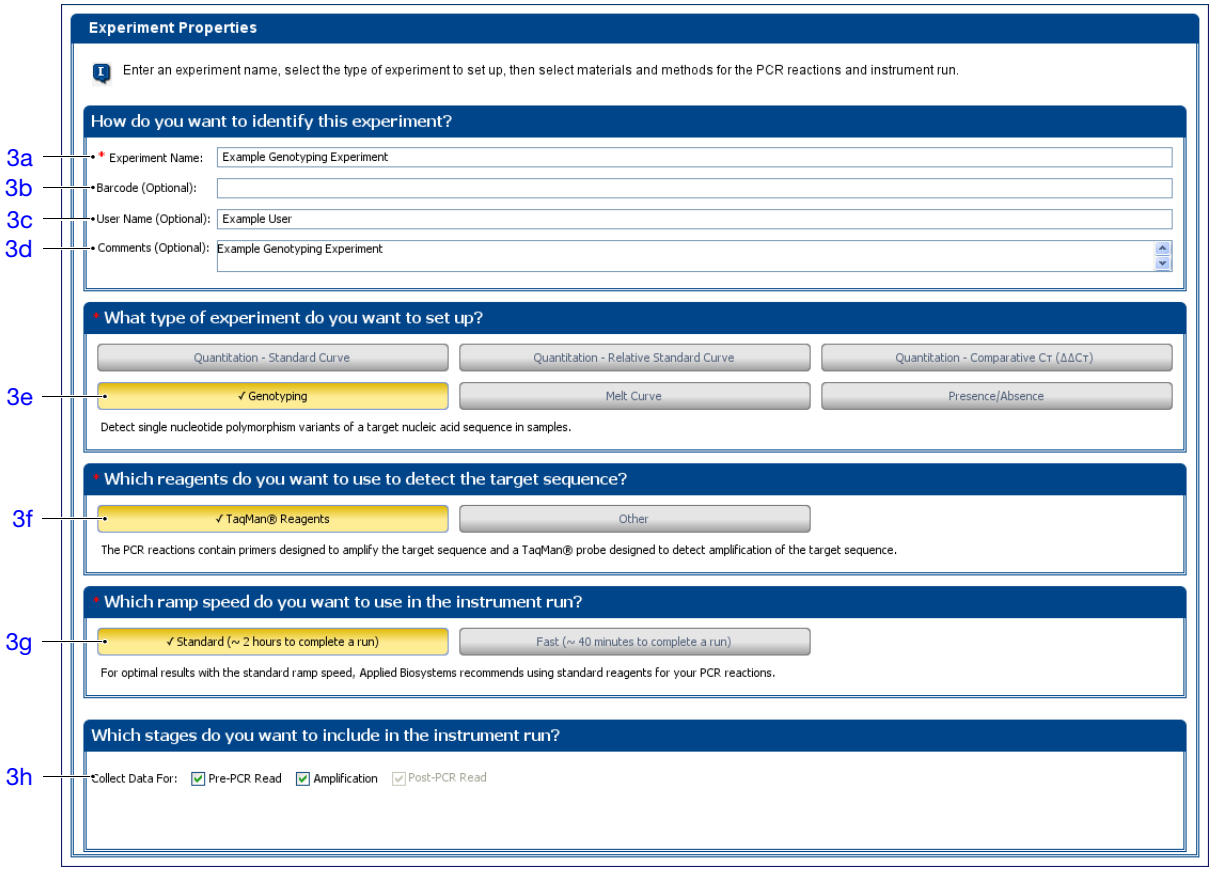
Informationen zum Setup für Fortgeschrittene

Im Setup für Fortgeschrittene werden die meisten der Aufgaben, die vom Analysedesign-Assistenten ausgeführt werden, zusammengelegt. Viele Punkte aus Kapitel 2, in dem die Erstellung einer Analyse mit Analysedesign-Assistent erläutert wird, werden hierbei umgangen.

So erstellen Sie eine Analyse

1. Klicken Sie auf der Startseite der StepOne™-Software auf unterhalb der Spalte Setup (Einstellungen).
2. Klicken Sie auf **Advanced Setup** (Setup für Fortgeschrittene).
3. Geben Sie die Eigenschaften der Beispielanalyse ein:
   a. Klicken Sie in das Feld **Experiment Name** (Analysename), und geben Sie dann **Genotyping Example** (Genotypisierungs-Beispielanalyse) ein.
   b. Klicken Sie in das Feld **Barcode**, geben Sie dann das **Example** (Beispiel) ein.
   c. Klicken Sie in das Feld **User Name** (Benutzername), geben Sie dann den **Example User** (Beispielbenutzer) ein.
   d. Klicken Sie in das Feld **Comments** (Anmerkungen), geben Sie dann **Genotyping Getting Started Guide** (Einführungshandbuch zur Genotypisierung) ein.
   e. Wählen Sie als Analysetyp **Genotyping** (Genotypisierung) aus.
   f. Wählen Sie als Reagenzien **TaqMan® Reagents** aus.
   g. Wählen Sie als Heiz-/Kühlgeschwindigkeit **Standard (~2 hours to complete a run)** [Standard (ca. 2 Stunden für einen Lauf)] aus.
   h. Wählen Sie **Pre-PCR Read** (Prä-PCR-Messung) und **Amplification** (Amplifikation), um die Stadien des Lauftyps hinzuzufügen.

Hinweise


Experiment Properties
Enter an experiment name, select the type of experiment to set up, then select materials and methods for the PCR reactions and instrument run.
How do you want to identify this experiment?
3a
* Experiment Name:
Example Genotyping Experiment
3b
Barcode (Optional):
3c
User Name (Optional):
Example User
3d
Comments (Optional):
Example Genotyping Experiment
* What type of experiment do you want to set up?
Quantitation - Standard Curve
Quantitation - Relative Standard Curve
Quantitation - Comparative CT (ΔΔCT)
3e
✓ Genotyping
Melt Curve
Presence/Absence
Detect single nucleotide polymorphism variants of a target nucleic acid sequence in samples.
* Which reagents do you want to use to detect the target sequence?
3f
✓ TaqMan® Reagents
Other
The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and a TaqMan® probe designed to detect amplification of the target sequence.
* Which ramp speed do you want to use in the instrument run?
3g
✓ Standard (~ 2 hours to complete a run)
Fast (~ 40 minutes to complete a run)
For optimal results with the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends using standard reagents for your PCR reactions.
Which stages do you want to include in the instrument run?
3h
Collect Data For:
Pre-PCR Read
Amplification
Post-PCR Read

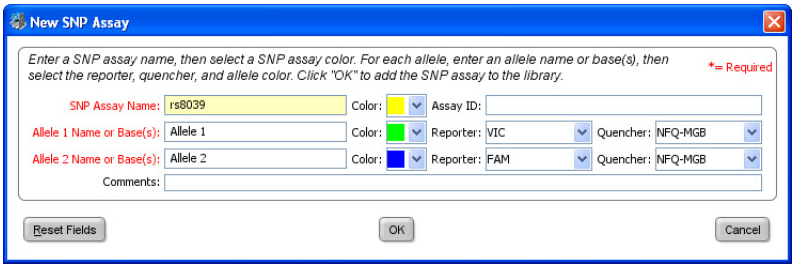
4. Klicken Sie in der Spalte Navigation auf **Plate Setup** (Platteneinrichtung).

5. Erstellen Sie den SNP-Assay rs8039 für die Plattenbelegung:

   a. Klicken Sie auf **Create New SNP Assay** (Neuen SNP-Assay erstellen).

   b. Klicken Sie in das Feld SNP Assay Name und geben Sie **rs8039** ein.

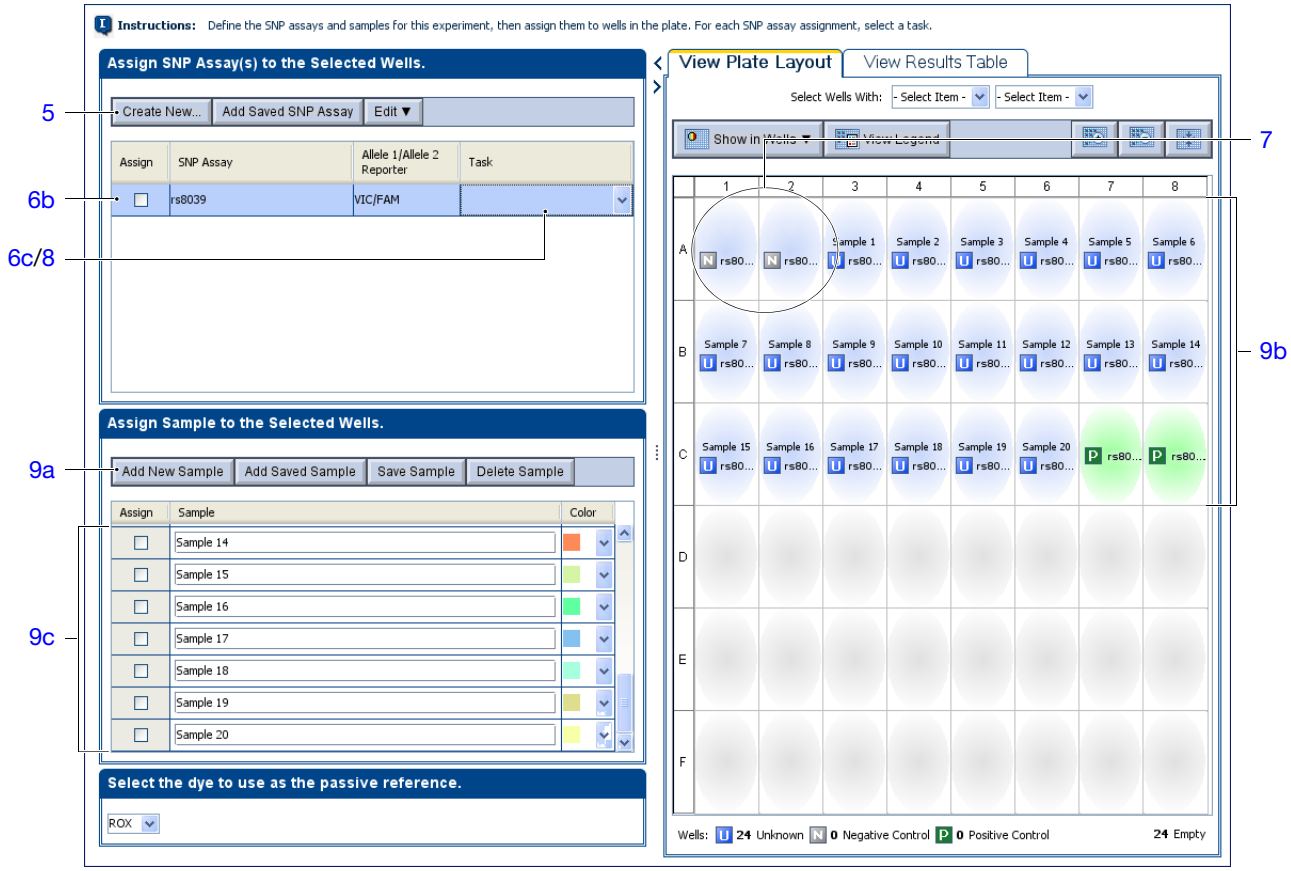
   c. Klicken Sie auf **OK**.



Hinweise

6. Richten Sie die unbekannten Proben ein.
    a. Wählen Sie in der Plattenbelegung die Reihen **A** und **B**.
    b. Aktivieren Sie in der Liste der SNP-Assays das Kontrollkästchen Assign (Zuweisen) für den SNP-Assay rs8039, um ausgewählte Wells als solche zu markieren.
    c. Klicken Sie auf das Dropdown-Menü unter Task (Aufgabe) für den SNP-Assay rs8039, und wählen Sie anschließend **Unknown** (Unbekannt), um diese Aufgabe den ausgewählten Wells hinzuzufügen.
7. Wählen Sie in der Plattenbelegung die Reihen **A1** und **A2**.
8. Klicken Sie auf das Dropdown-Menü unter Task (Aufgabe) für den SNP-Assay rs8039, und wählen Sie anschließend **Negative Control** (Negativkontrolle), um diese Aufgabe den ausgewählten Wells hinzuzufügen.
9. Erstellen Sie Proben und weisen Sie diese der Plattenbelegung zu:
    a. Klicken Sie wiederholt auf **Create New Sample** (Neue Probe erstellen), bis die Probenliste 20 Proben enthält.
    b. Wählen Sie in der Plattenbelegung die Reihe **A4**.
    c. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen Assign (Zuweisen) für Probe 1, um den Assay der Probe und dem ausgewählten Well zuzuweisen.
    d. Wiederholen Sie die Schritte 9b bis 9c, um die Proben wie unten dargestellt zuzuweisen.

Hinweise



10. Klicken Sie in der Spalte Navigation auf **Run Method** (Lauftyp), und richten Sie den Lauftyp ein:

    a. Klicken Sie in das Feld Reaction Volume Per Well (Reaktionsvolumen pro Well), und geben Sie **25** ein.

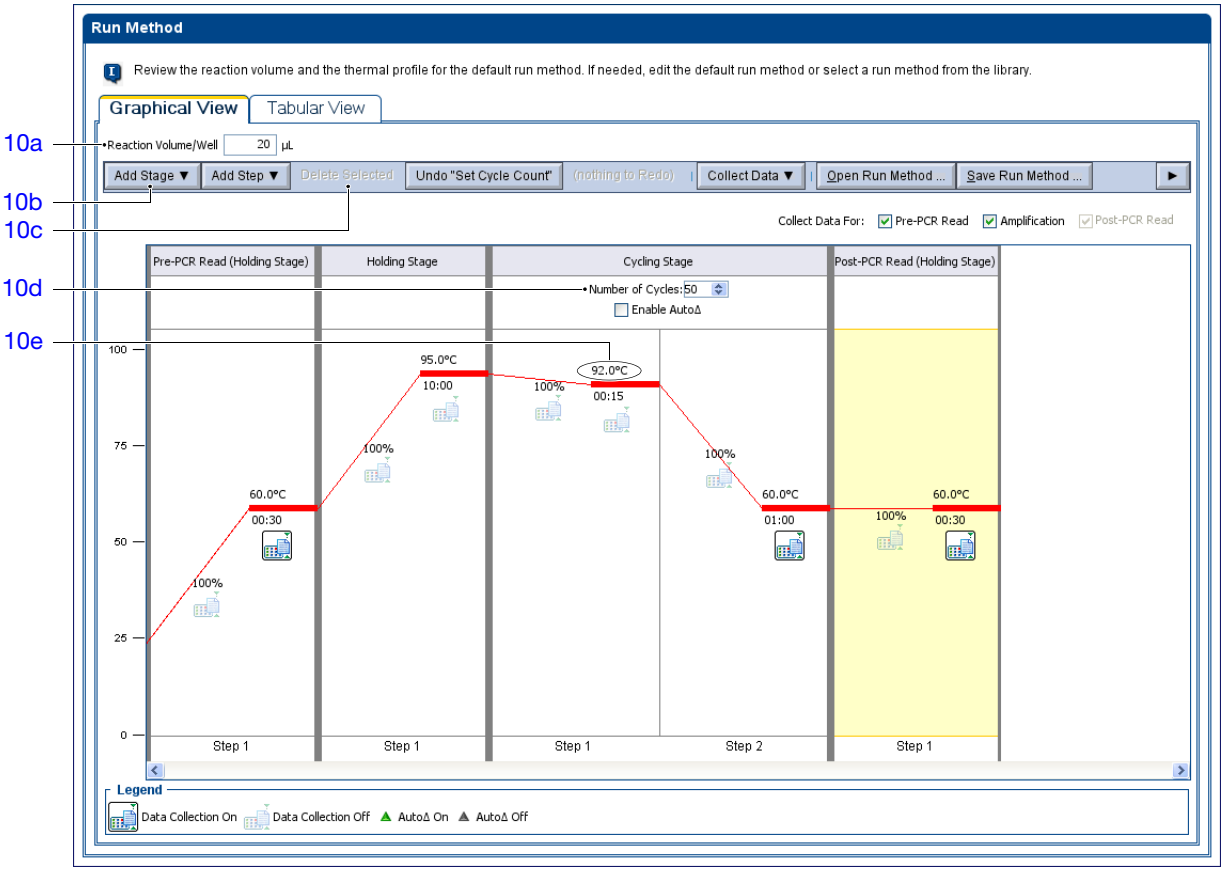
    b. Klicken Sie auf Pre-PCR Read (Holding Stage) (Prä-PCR-Messung, Haltephase), **Add Stage** (Phase hinzufügen) und anschließend auf **Holding** (Halten)

    c. Wählen Sie den ersten Schritt (50 °C/00:02:00) der neuen Haltephase, und klicken Sie anschließend auf **Delete Selected** (Auswahl löschen), um den Extraschritt zu löschen.

    d. Klicken Sie auf das Feld **Number of Cycles** (Anzahl der Zyklen), und geben Sie **50** ein.

    e. Klicken Sie auf die Temperatureinstellung für den ersten Schritt der Cycling-Phase (95 °C/00:00:15), und geben Sie **92** °C ein.

Hinweise



11. Klicken Sie auf **Save** (Speichern) und anschließend im Dialogfeld Save Experiment (Analyse speichern) auf **Save** (Speichern), um die Analyse als Genotyping Example.eds abzuspeichern.

12. Bereiten Sie die Reaktionen vor, wie in Kapitel 3, „Ansetzen der Reaktionen“, auf Seite 35 erläutert vor.

13. Lassen Sie die Analyse wie in Kapitel 4, „Analysedurchführung“, auf Seite 45 dargestellt ablaufen.

14. Werten Sie die Analyse aus, wie in Kapitel 5, „Analyseauswertung“, auf Seite 71 beschrieben.

Hinweise

QuickStart-Arbeitsablauf

Wenn Sie eine Genotypisierungsanalyse über QuickStart erstellen, können Sie die Reaktionen auf dem Gerät analysieren lassen, ohne weitere Daten zur Einrichtung der Reaktionsplatte eingeben zu müssen.

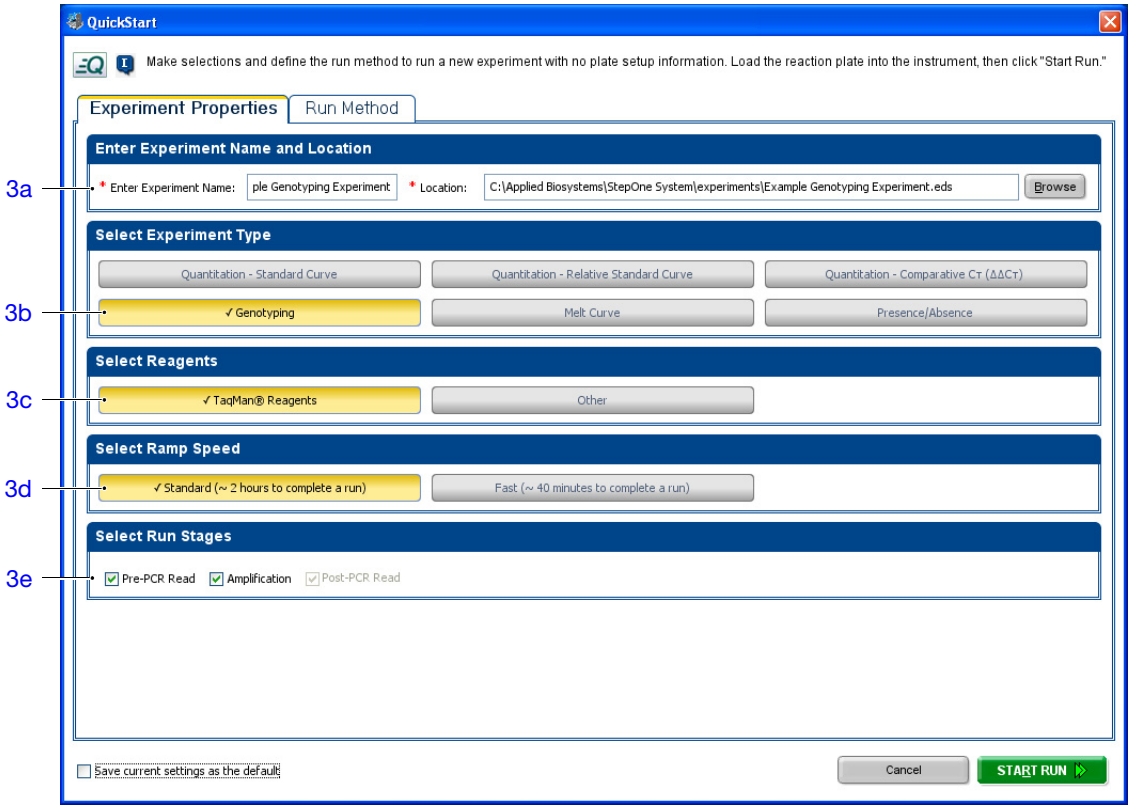
Informationen zur QuickStart-Einrichtung

Die StepOne™-Software verfügt über einen QuickStart-Modus, der die meisten Schritte aus Kapitel 2 umgeht. Wenn Sie mit den erforderlichen Aufgaben zur Einrichtung einer Analyse vertraut sind, können Sie Ihre Analysen über QuickStart sofort ausführen und später bearbeiten.

So erstellen Sie eine Analyse

1. Bereiten Sie die Reaktionen wie in Kapitel 3, „Ansetzen der Reaktionen“, auf Seite 35 erläutert vor.
2. Klicken Sie im Bildschirm Home (Startseite) auf **QuickStart**.
3. Geben Sie die Eigenschaften der Beispielanalyse ein:
   a. Klicken Sie in das Feld **Enter Experiment Name** (Analysename), und geben Sie dann **Genotyping Example** (Genotypisierungs-Beispiel) ein.
   b. Wählen Sie als Analysetyp **Genotyping** (Genotypisierung) aus.
   c. Wählen Sie als Reagenzien **TaqMan® Reagents** aus.
   d. Wählen Sie als Heiz-/Kühlgeschwindigkeit **Standard (~2 hours to complete a run)** [Standard (ca. 2 Stunden für einen Lauf)] aus.
   e. Wählen Sie **Pre-PCR Read** (Prä-PCR-Messung) und **Amplifikation** (Amplifikation), um die Stadien des Lauftyps hinzuzufügen.

Hinweise



4. Wählen Sie den Reiter **Run Method** (Lauftyp), und richten Sie anschließend den Lauftyp ein.

   a. Klicken Sie in das Feld Reaction Volume Per Well (Reaktionsvolumen pro Well), und geben Sie **25** ein.

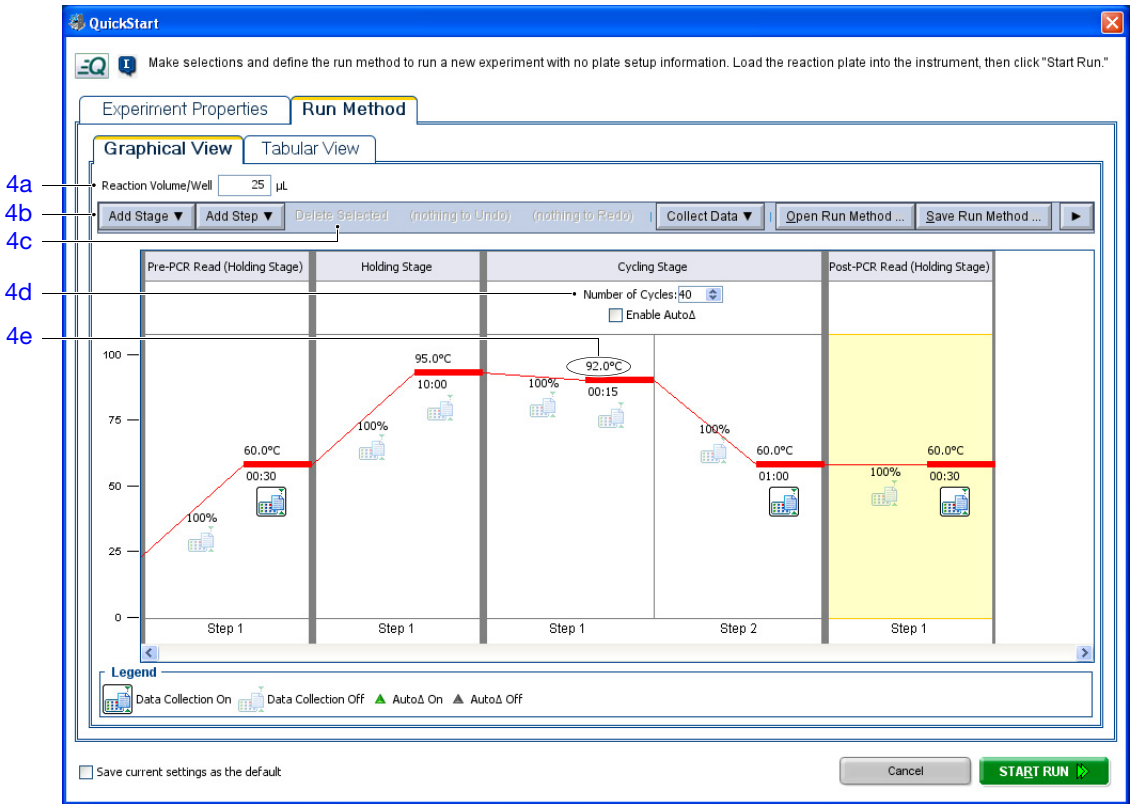
   b. Klicken Sie auf Pre-PCR Read (Holding Stage) (Prä-PCR-Messung, Haltephase), **Add Stage** (Phase hinzufügen) und anschließend auf **Holding** (Halten).

   c. Wählen Sie den ersten Schritt (50 °C/00:02:00) der neuen Haltephase, und klicken Sie anschließend auf **Delete Selected** (Auswahl löschen), um den Extraschritt zu löschen.

   d. Klicken Sie auf das Feld **Number of Cycles** (Anzahl der Zyklen), und geben Sie **50** ein.

   e. Klicken Sie auf die Temperatureinstellung für den ersten Schritt der Cycling-Phase (95 °C/00:00:15), und geben Sie **92** °C ein.

Hinweise



5. Bereiten Sie die Reaktionen vor, wie in Kapitel 3, „Ansetzen der Reaktionen“, auf Seite 35 erläutert.

6. Legen Sie die Reaktionen in das StepOne™-System wie unter „Einlegen der Reaktionsplatte“ auf Seite 48 beschrieben.

7. Klicken Sie in der StepOne™-Software auf **START RUN** (LAUF STARTEN).

   Während das StepOne™-System den Lauf ausführt, richten Sie die Plattenbelegung wie unter Schritte 8 bis 13 beschrieben ein.

8. Während das StepOne™-System die Platte analysiert, klicken Sie in der Navigationsspalte auf **Plate Layout** (Plattenbelegung).

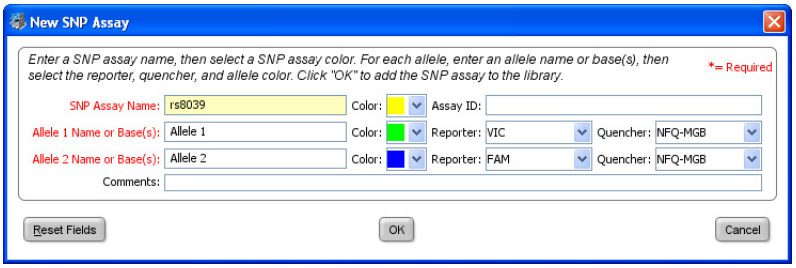
9. Erstellen Sie den SNP-Assay rs8039 für die Plattenbelegung:

   a. Klicken Sie auf **Create New SNP Assay** (Neuen SNP-Assay erstellen).

   b. Klicken Sie in das Feld SNP Assay Name und geben Sie **rs8039** ein.

   c. Klicken Sie auf **OK**.

Hinweise



10. Richten Sie die Unbekannten ein.

    a. Wählen Sie in der Plattenbelegung die Reihen **A** und **B**.

    b. Aktivieren Sie in der Liste der SNP-Assays das Kontrollkästchen Assign (Zuweisen) für den SNP-Assay rs8039, um diesen den ausgewählten Wells zuzuweisen.

    c. Klicken Sie auf das Dropdown-Menü unter Task (Aufgabe) für den SNP-Assay rs8039, und wählen Sie anschließend **Unknown** (Unbekannt), um ausgewählte Wells als solche zu markieren.

11. Wählen Sie in der Plattenbelegung die Reihen **A1** und **A2**.

12. Klicken Sie auf das Dropdown-Menü unter Task (Aufgabe) für den SNP-Assay rs8039, und wählen Sie anschließend **Negative Control** (Negativkontrolle), um diese Aufgabe den ausgewählten Wells hinzuzufügen.

13. Erstellen Sie Proben und weisen Sie diese der Plattenbelegung zu:

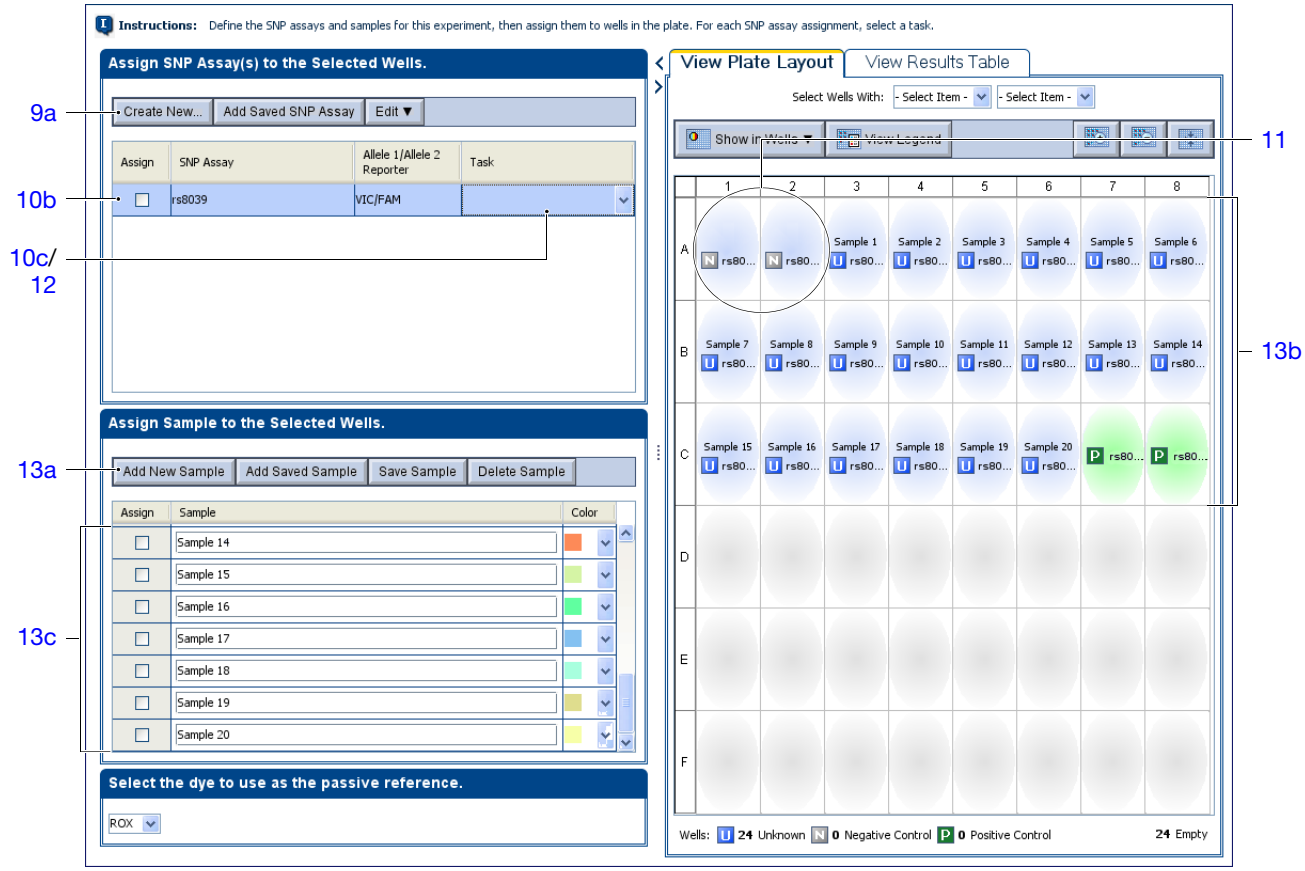
    a. Klicken Sie wiederholt auf **Create New Sample** (Neue Probe erstellen), bis die Probenliste 20 Proben enthält.

    b. Wählen Sie in der Plattenbelegung die Reihe **A4**.

    c. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen Assign (Zuweisen) für Probe 1, um den Assay der Probe und dem ausgewählten Well zuzuweisen.

    d. Wiederholen Sie die Schritte 13a bis 13c, um die Proben wie unten dargestellt zuzuweisen.

Hinweise



14. Wenn das StepOne™-System den Lauf abgeschlossen hat, werten Sie die Analyse wie unter Kapitel 5, „Analyseauswertung“, auf Seite 71 beschrieben aus.

Hinweise

Verwenden von Vorlagen

Wenn Sie ein Template für eine Analyse erstellen, können Sie nachfolgende Analysen mit denselben Einrichtungsdaten erstellen.

Informationen zu Templates

Die StepOne™-Software bietet die Möglichkeit, Templates zur Erstellung von Analysen zu erstellen. Templates sind vor allem bei Analysen, bei denen die Proben nach identischen Plattenbelegungen und unter denselben Analysebedingungen analysiert werden, hilfreich und zeitsparend.

So erstellen Sie eine Analyse

1. Erstellen Sie eine Analyse wie in Kapitel 2, „Experimentelles Design“, auf Seite 13 beschrieben.
2. Wählen Sie **File** ▸ **Save As Template** (Datei ▸ Als Vorlage speichern) und klicken Sie anschließend im Dialogfeld Save Experiment (Analyse speichern) auf **Save** (Speichern). Speichern Sie die Analyse als Genotyping Example.edt.
3. Klicken Sie auf **Close** (Schließen).
4. Erstellen Sie eine Analyse mithilfe eines Templates:
   a. Klicken Sie im Bildschirm Home (Startseite) auf und anschließend auf **Template** (Vorlage).
   b. Wählen Sie im Dialogfeld Open (Öffnen) die Datei **Example Genotyping.edt** und anschließend **Open** (Öffnen).
   c. Ändern Sie die Analyse mithilfe der Werkzeuge im Arbeitsablauf Advanced Setup (Erweiterte Einrichtung).
   d. Wählen Sie aus der Dropdownliste der Dateitypen **Experiment Document Template files (*.edt)**.
   e. Klicken Sie auf **Save** (Speichern), geben Sie einen Namen für die Analysedatei ein, und klicken Sie zum Speichern der Analyse auf **Save** (Speichern).
5. Bereiten Sie die Reaktionen vor, wie in Kapitel 3, „Ansetzen der Reaktionen“, auf Seite 35 erläutert.
6. Lassen Sie die Analyse wie in Kapitel 4, „Analysedurchführung“, auf Seite 45 dargestellt ablaufen.
7. Werten Sie die Analyse aus, wie in Kapitel 5, „Analyseauswertung“, auf Seite 71 beschrieben.
8. Wiederholen Sie die Schritte 4 bis 7 nach Bedarf, um weitere Analysen aus der Vorlage zu erstellen.

Hinweise

Arbeitsablauf für den Export/Import

Wenn Sie eine Genotypisierungsanalyse mithilfe des Arbeitsablaufs Export/Import erstellen, können Sie eine neue Analyse mit aus anderen Analysen exportierten Daten einrichten.

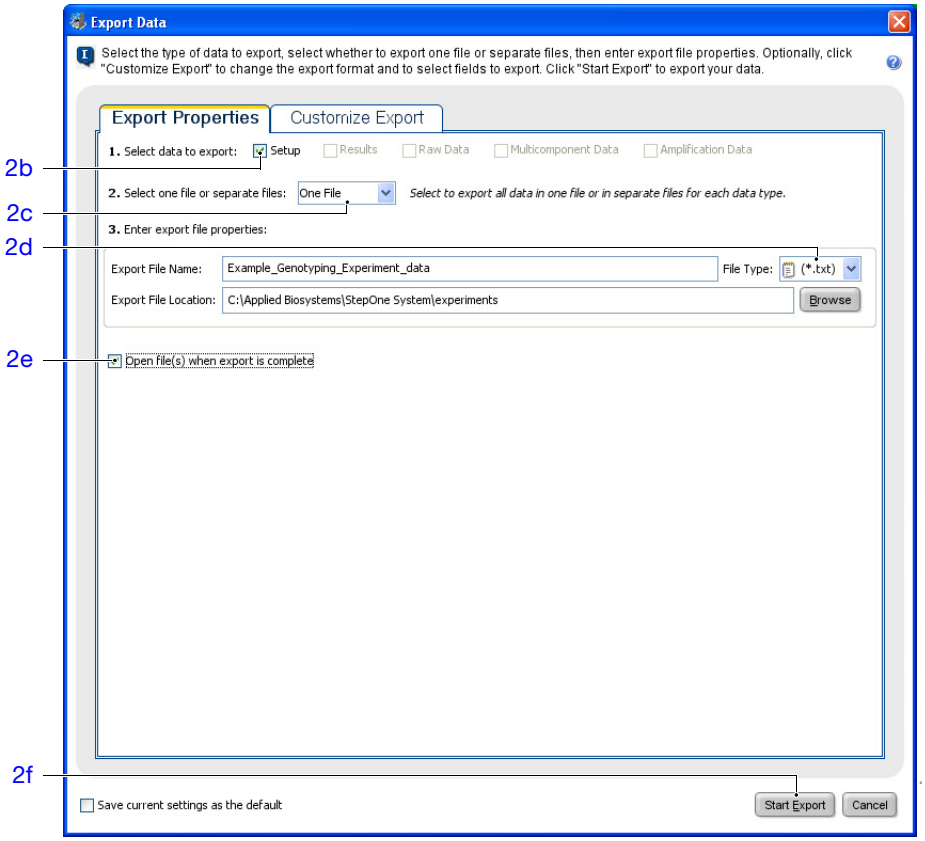
Informationen zum Einrichten von Import/Export

Die StepOne™-Software kann Analysedesigns aus ASCII-Textdateien importieren, die Einrichtungsdaten für Analysen in dem Plattenbelegungsformat der StepOne™-Software enthalten. Die Importfunktion ist vor allem dann nützlich, wenn mehrfache Analysen durchgeführt werden, da viele der in Kapitel 2 beschriebenen Schritte automatisiert sind.

So erstellen Sie eine Analyse

1. Erstellen Sie eine Analyse wie in Kapitel 2, „Experimentelles Design“, auf Seite 13 beschrieben.
2. Exportieren Sie die Einrichtungsdaten aus der geöffneten Analyse wie folgt:
   a. Wählen Sie **File** (Datei) ▸ **Export**.
   b. Wählen Sie in den Reiter Export Properties (Exporteinstellungen) **Setup** (Einrichten).
   c. Wählen Sie im Dropdown-Menü **One File** (Eine Datei).
   d. Wählen Sie im Dropdown-Menü File Type (Dateiart) **(*.txt)**.
   e. Wählen Sie **Open file(s) when export is complete** (Datei(en) nach Abschluss des Exports öffnen).
   f. Klicken Sie auf **Start Export** (Export starten) und anschließend bei Aufforderung **Close Export Tool** (Export-Tool schließen).

Hinweise


Export Data
Select the type of data to export, select whether to export one file or separate files, then enter export file properties. Optionally, click "Customize Export" to change the export format and to select fields to export. Click "Start Export" to export your data.
Export Properties
Customize Export
1. Select data to export:
Setup
Results
Raw Data
Multicomponent Data
Amplification Data
2. Select one file or separate files:
One File
Select to export all data in one file or in separate files for each data type.
3. Enter export file properties:
Export File Name:
Example_Genotyping_Experiment_data
File Type:
(*.txt)
Export File Location:
C:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments
Browse
Open file(s) when export is complete
Save current settings as the default
Start Export
Cancel
2b
2c
2d
2e
2f

3. Erstellen Sie unter Verwendung der exportierten Datei als Vorlage die gewünschte Platteneinrichtung:

   a. Öffnen Sie die exportierte Textdatei in einem Tabellenkalkulationsprogramm (z. B. Microsoft Excel®).

   b. Ändern Sie die gewünschten Parameter in der Textdatei je nach Bedarf. Wenn Sie damit fertig sind, speichern Sie die Datei als tabulatorgetrennte Textdatei ab.

WICHTIG! Die Textdatei muss entsprechend dem Plattenbelegungsformat der StepOne™-Software formatiert sein. Weitere Informationen zum Plattenbelegungsformat erhalten Sie in der Hilfe, indem Sie in der Symbolleiste auf klicken oder **Help** ▸ **StepOne Help Topics** (Hilfe ▸ StepOne Hilfethemen) wählen.

4. Klicken Sie in der StepOne™-Software unterhalb der Spalte Setup auf und anschließend auf **Advanced Setup** (Setup für Fortgeschrittene).

Hinweise

5. Importieren Sie die Einrichtungsdaten:
   a. Wählen Sie **File** ▸ **Import** (Datei ▸ Importieren).
   b. Klicken Sie auf **Browse** (Durchsuchen), wählen Sie die Datei **Genotyping_Example_data.txt** und klicken Sie anschließend auf **Select** (Auswählen).
   c. Klicken Sie auf **Start Import** (Import starten).
6. Bereiten Sie die Reaktionen vor, wie in Kapitel 3, „Ansetzen der Reaktionen“, auf Seite 35 erläutert.
7. Lassen Sie die Analyse wie in Kapitel 4, „Analysedurchführung“, auf Seite 45 dargestellt ablaufen.
8. Werten Sie die Analyse aus, wie in Kapitel 5, „Analyseauswertung“, auf Seite 71 beschrieben aus.
9. Wiederholen Sie die Schritte 3 bis 8 nach Bedarf, um weitere Analysen aus der exportierten Datei zu erstellen.

Hinweise

Hinweise

Bibliografie

Afonina, I., Zivarts, M., Kutyavin, I., *et al.,* **1997**. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 25:2657–2660.

Kutyavin, I.V., Lukhtanov, E.A., Gamper, H.B., and Meyer, R.B. **1997**. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res.* 25:3718–3723.

Kwok, S. and Higuchi, R. **1989**. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.

Lakowicz, J.R. **1983**. Energy Transfer. In Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press 303–339.

Lee, L. G., Connell, C. R., and Block, W. **1993**. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21:3761–3766.

Livak, K.J., Marmaro, J., and Todd, J.A. **1995**. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening [letter]. *Nat. Genet.* 9:341–342.

Longo, M.C., Berninger, M.S., and Hartley, J.L. **1990**. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125–128.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. **1987**. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335–350.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.,* **1985**. Enzymatic amplification of ß-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.

Glossar

AIF	Abkürzung für Assay-Informationsdatei
Allel	Eine der verschiedenen in der Population auftretenden Ausprägungen einer bestimmten Zielsequenz.
Allelic Discrimination Plot (Alleldiskriminierungs-plot)	Anzeige von Daten, die bei der Post-PCR-Messung erfasst wurden. Der sog. Allelic Discrimination Plot ist eine grafische Darstellung des normalisierten Reportersignals der Sonde für Allel 1 im Vergleich zum normalisierten Reportersignal der Sonde für Allel 2.
Amplification Plot (Darstellung der Amplifikation)	Anzeige von Daten, die während der Zyklusphase der PCR-Amplifikation erfasst wurden. Diese können wie folgt angezeigt werden: • Grundlinienkorrigierter normalisierter Reportersignal (ΔR_n) über dem Zyklus • Normalisiertes Reportersignal (R_n) über den Zyklus • Schwellenwert-Zyklus (C_T) über dem Well
Amplifikation	Teil des Gerätelaufs, während dessen die PCR zur Amplifikation der Zielsequenz erfolgt. Für Quantifizierungsanalysen werden die während der Amplifikation gemessenen Fluoreszenzdaten in einem sog. Amplification Plot dargestellt und zur Berechnung von Ergebnissen verwendet. Wenn im StepOne™-System für eine Genotypisierungs- oder Positiv/Negativ-Analyse eine Amplifikation durchgeführt wird, werden die während der Amplifikation gemessenen Fluoreszenzdaten in einem sog. Amplification Plot dargestellt und können zur Fehlerbehebung verwendet werden.
Amplifikationseffizienz (EFF%)	Berechnete Effizienz der PCR-Amplifikation. Die Amplifikationseffizienz wird mithilfe der Steigung der Regressionsgeraden in der Standardkurve berechnet. Eine Steigung von etwa −3,3 bedeutet eine optimale, 100%ige PCR-Amplifikationseffizienz. Faktoren, die die Amplifikationseffizienz beeinflussen, sind: • **Bereich der Standardkonzentrationen** - Um eine korrekte und genaue Effizienzbestimmung durchzuführen, verwenden Sie einen breiten Bereich von Standardkonzentrationen, 5 bis 6 Log-Stufen (10^5 bis 10^6fach). • **Anzahl der Standardreplikate** - Um eine präzise Effizienzbestimmung durchzuführen, führen Sie Replikate durch, um die Auswirkungen von Pipettierfehlern zu reduzieren. • **PCR-Inhibitoren** - PCR-Inhibitoren in der Reaktion können die Amplifikationseffizienz herabsetzen.
Amplikon	Ein mittels PCR amplifiziertes DNA-Segment.

Analyse

Bezieht sich auf den gesamten Prozess der Durchführung eines Laufs mithilfe des StepOne™-Systems, einschließlich Einrichtung, Lauf und Auswertung. Analysetypen, die Sie mit dem StepOne™-System durchführen können, sind:

- Quantifizierung – Standardkurve
- Quantifizierung – relative Standardkurve
- Quantifizierung – vergleichender C_T ($\Delta\Delta C_T$)
- Schmelzkurve
- Genotypisierung
- Positiv/Negativ

Analysedesign-Assistent

Funktion in der StepOne™-Software, die Ihnen bei der Einrichtung der Analyse entsprechend Ihrem Analysedesign hilft, indem Sie durch bewährte Schritte geführt werden.

Analysename

Dieser Name wird während der Analyseeinrichtung eingegeben und dient der Identifizierung der Analyse. Analysenamen dürfen nicht länger als 100 Zeichen sein und keine der folgenden Zeichen enthalten: Schrägstrich (/), umgekehrter Schrägstrich (\), Größer-als-Zeichen (>), Kleiner-als-Zeichen (<), Stern (*), Fragezeichen (?), Anführungszeichen ("), vertikale Linie (|), Doppelpunkt (:) oder Semikolon (;).

Analysetyp

Analysetyp, den Sie mit dem StepOne™-System durchführen:

- Standardkurve
- Vergleichender C_T ($\Delta\Delta C_T$)
- Relative Standardkurve
- Schmelzkurve (nicht verfügbar im Analysedesign-Assistenten)
- Genotypisierung
- Positiv/Negativ

Der von Ihnen ausgewählte Analysetyp spiegelt sich in den Bildschirmen Setup, Run und Analysis (Einrichtung, Lauf und Analyse) wieder.

Assay

Im StepOne™-System eine PCR-Reaktion, die Primer zur Amplifikation einer Zielsequenz und ein Reagens zur Detektion amplifizierter Zielsequenzen enthält.

Assay ID

Eine Größe, die TaqMan®-Genexpressions und TaqMan®-SNP-Genotypisierungs-Assays von Applied Biosystems zugewiesen wird.

Assay-Informationsdatei (AIF)

Datei auf der CD, die bei jedem Assay mitgeliefert wird. Der Dateiname enthält die Nummer des Strichcodes auf der Platte. Die Informationen im AIF werden in einem tabulatorgetrennten Format bereitgestellt.

Assay-Mix

PCR-Reaktionskomponente in TaqMan®-Genexpressions-Assays und TaqMan®-SNP-Genotypisierungs-Assays von Applied Biosystems, die aus Primern zur Amplifikation einer Zielsequenz und einer TaqMan®-Sonde zur Detektion der Amplifikation der Zielsequenz besteht.

Aufgabe (task)

Reaktionstyp, der in einem Well für die Zielsequenz oder den SNP-Assay durchgeführt wird. Mögliche Aufgaben in StepOne™-System -Analysen sind:

- Unbekannt
- Negativkontrolle
- Standard (Standardkurven- und relative Standardkurven-Analysen)
- Positivkontrolle (Genotypisierungsanalysen)
- IPC (Positiv/Negativ-Analysen)
- Blockierte IPC (Positiv/Negativ-Analysen)

Auftragsbezogene Assays

TaqMan®-Genomassays, die zum Zeitpunkt des jeweiligen Auftrags hergestellt werden. Nur Assays, die die Anforderungen der Produktionsqualitätskontrolle erfüllen, werden ausgeliefert.

Ausgangsmenge

Entspricht bei der Definition einer Standardkurve oder Standardverdünnungsreihe der größten oder geringsten Menge.

Ausreißer

Ein Datenpunkt in einem bestimmten Datensatz, der signifikant kleiner oder größer als die anderen ausfällt.

AutoΔ

Einstellung zur Erhöhung oder Reduzierung der Temperatur und/oder Zeit mit jedem darauffolgenden Zyklus in einer Zyklusphase. Wenn AutoΔ aktiviert ist, werden die Einstellungen durch ein Symbol im Thermoprofil angezeigt:

- AutoΔ ein: ▲
- AutoΔ aus: ▲

Automatische Grundlinie

Analyseeinstellung, bei der die Grundlinien-Start- und Endwerte für den Amplification Plot (Amplifikationsdarstellung) von der Software berechnet werden. Die Software verwendet Grundlinie und Schwellenwert zur Berechnung des Schwellenwert-Zyklus (C_T).

Automatischer C_T

Analyseeinstellung, bei der Schwellenwert und Grundlinie in der Darstellung der Amplifikation von der Software automatisch berechnet werden. Die Software verwendet Schwellenwert und Grundlinie zur Berechnung des Schwellenwert-Zyklus (C_T).

Blockierte IPC

In Positiv/Negativ-Analysen die Aufgabe, die der IPC-Zielsequenz in Wells zugewiesen wird, welche IPC-Inhibitoren statt des Proben-Templates enthalten. Siehe auch unter Negativkontrolle mit blockierter IPC.

Chemie

Siehe unter Reagenzien.

Computergesteuerte Konfiguration

Eine Systemkonfiguration, bei der das StepOne™-System durch das gelbe StepOne™-System-Kabel mit einem angeschlossenen Computer direkt verbunden ist. Bei dieser Konfiguration wird das StepOne™-System durch die StepOne™-Software auf dem angeschlossenen Computer gesteuert.

C_T

Abkürzung für Schwellenwert-Zyklus.

Datenerfassung

Ein Prozess während des Gerätelaufs, bei dem eine Gerätekomponente von jedem Well der Reaktionsplatte Fluoreszenzdaten erfasst. Das Gerät wandelt das Signal in elektronische Daten um, und diese werden in der Analysedatei gespeichert. Ein Datenerfassungspunkt wird durch ein Symbol im Thermoprofil angezeigt:

- Datenerfassung ein:
- Datenerfassung aus:

Delta R_n (ΔR_n)

Abkürzung für grundlinienkorrigiertes normalisiertes Reportersignal.

Dissoziationskurve

Siehe unter Schmelzkurve.

EFF%

Siehe unter Amplifikationseffizienz (EFF%).

Eigenständige Konfiguration

Eine Systemkonfiguration, bei der das StepOne™-System *nicht* durch das gelbe StepOne™-Systemkabel mit einem Computer verbunden ist. Stattdessen wird ein USB-Laufwerk ( ) zur Übertragung von Daten zwischen StepOne™-System-Komponenten verwendet. Bei dieser Konfiguration wird das StepOne™-System durch den Touchscreen des Geräts gesteuert.

Endogene Kontrolle

Zielsequenz, die in allen analysierten Proben auf demselben Niveau vorhanden sein sollte. Wird in relativen Standardkurven- und vergleichenden C_T ($\Delta\Delta C_T$)-Analysen zur Normalisierung des Fluoreszenzsignals für die zu quantifizierende Zielsequenz verwendet. Wird auch als Haushaltsgen bezeichnet.

Endpunktanalyse

Analyse, bei der die bei einer Post-PCR-Messung erfassten Fluoreszenzdaten zur Berechnung von Ergebnissen für Genotypisierungs- oder Positiv/Negativ-Analysen verwendet werden.

Endpunktmessung

Siehe unter Post-PCR-Messung.

Farbstoff

Reagens, das den Fluoreszenzfarbstoff enthält. Farbstoffe werden zur Durchführung einer Kalibrierung auf dem StepOne™-System verwendet, siehe auch unter Systemfarbstoff.

Farbstoffe von Fremdanbietern

Nicht von Applied Biosystems hergestellte Farbstoffe. Sie können zur Durchführung von Real-Time PCR-Analysen auf dem StepOne™-System Farbstoffe von Fremdanbietern verwenden. Bevor Sie diese verwenden, führen Sie eine Kalibrierung der jeweiligen Farbstoffe durch.

WICHTIG! Applied Biosystems empfiehlt nicht die Verwendung von TAMRA™ Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne™-System.

Fernüberwachung

Funktion in der Software, die es Ihnen erlaubt, den Status eines vernetzten Gerätes anzusehen, Analysen an das Gerät zu schicken und abgeschlossene Analysen auf Ihren Computer herunterzuladen.

Forward Primer

Oligonukleotid, das an das 5′-Ende der Zielsequenz bindet. Der Reverse Primer und der Forward Primer werden zusammen in PCR-Reaktionen eingesetzt, um die Zielsequenz zu amplifizieren.

Grundlinie

In der Darstellung der Amplifikation eine an die Fluoreszenz angepasste Linie für eine bestimmte Reihe von Zyklen. Wenn Sie die manuelle Grundlinienanalyseeinstellung verwenden, empfiehlt Applied Biosystems, dass Sie frühe PCR-Zyklen für die Festlegung der Grundlinie wählen.

Grundlinienkorrigierter normalisierter Reporter (ΔR_n) über dem Zyklus

Die Intensität des vom Reporter während der PCR-Amplifikation generierten normalisierten Fluoreszenzsignals.

$\Delta R_n = R_n$ (Endpunkt) − R_n (Grundlinie), wobei R_n = normalisierter Reporter.

Haltephase

Phase im Thermoprofil, die eine oder mehrere Schritte umfasst. Zum Beispiel können Sie eine Haltephase zum Thermoprofil hinzufügen, um Enzyme zu aktivieren bzw. zu deaktivieren oder um eine Reaktion zu inkubieren.

Haushaltsgen

Siehe unter Endogene Kontrolle.

Heiz-/Kühlgeschwindigkeit

Geschwindigkeit, mit der die Temperaturrampe während des Geräteslaufs erscheint. Mögliche Heiz-/Kühlgeschwindigkeiten sind Fast (schnell) und Standard.

Interne Positivkontrolle (IPC)

In Positiv/Negativ-Analysen ein kurzes synthetisches DNA-Template, das zu PCR-Reaktionen hinzugegeben wird. Die IPC kann dazu verwendet werden, zwischen richtig negativen Ergebnissen und Reaktionen, die durch PCR-Inhibitoren, eine fehlerhafte Assay-Einrichtung oder einen Reagenzien- bzw. Gerätefehler beeinflusst wurden, zu unterscheiden.

Inventarisierte Assays

TaqMan®-Genomassays, die hergestellt wurden, die Anforderungen der Qualitätskontrolle bestanden haben und in ein Bestandsverzeichnis aufgenommen wurden.

IPC

Abkürzung für Interne Positivkontrolle. In Positiv/Negativ-Analysen auch die Aufgabe für die IPC-Zielsequenz in Wells, die ein IPC-Template enthalten.

IPC+

Positiv/Negativ-Bestimmung, wenn die interne Positivkontrolle (IPC) erfolgreich ist.

IPC-Inhibitor

Reagenz, das zu PCR-Reaktionen hinzugegeben wird, um die Amplifikation der internen Positivkontrolle zu unterdrücken.

IPC-Wells mit Negativkontrolle

In Positiv/Negativ-Analysen Wells, die ein IPC-Template und einen Puffer oder Wasser statt des Proben-Templates in der PCR-Reaktion enthalten. In IPC-Wells mit Negativkontrolle sollte nur das IPC-Template amplifizieren, da die Reaktion kein Proben-Template enthält, siehe auch unter IPC+.

Kalibrator

Siehe unter Referenzprobe.

Konzentration der verdünnten Probe (10× für Reaktionsmix)

Softwarefeld, das unter dem Reiter Sample Dilution Calculations (Berechnung der Probenverdünnung) des Bildschirms Reaction Setup (Reaktionseinrichtung) angezeigt wird. Geben Sie für dieses Feld die Probenkonzentration ein, die Sie bei allen Proben in einer Analyse zum Reaktionsmix hinzugeben möchten. "10× for Reaction Mix" gibt an, dass die Software annimmt, dass die Proben- oder Standardkomponente des Reaktionsmix mit einer 10fachen Konzentration vorliegt. Bei einer Konzentration der verdünnten Probe von 50,0 ng/µl (10×) beträgt die Endkonzentration der Probe in der Reaktion beispielsweise 5 ng/µl (1×).

Lauftyp Definition des Reaktionsvolumens und des Thermoprofils für den Gerätelauf.

Manuelle Grundlinie Analyseeinstellung, bei der die Grundlinien-Start- und Endwerte für die Amplifikationsdarstellung von der Software berechnet werden. Die Software verwendet Grundlinie und Schwellenwert zur Berechnung der C_T-Werte.

Manueller C_T Analyseeinstellung, bei der Sie den Schwellenwert eingeben und auswählen, ob Sie die automatische oder manuelle Grundlinienberechnung verwenden möchten. Die Software verwendet den von Ihnen eingegebenen Schwellenwert und die Grundlinie zur Berechnung des Schwellenwert-Zyklus (C_T).

Menge Die Zielsequenzmenge in den Proben bei Quantifizierungsanalysen. Absolute Mengen können sich auf Kopienzahl, Masse, Molarität oder Virusbelastung beziehen. Relative Mengen beziehen sich auf das Vielfache, um das sich die normalisierte Zielsequenzmenge in der Probe und die normalisierte Zielsequenzmenge in der Referenzprobe unterscheiden.

Multicomponent Plot (Multikomponenten-darstellung) Anzeige von Daten, die während der Zyklusphase der Real-time PCR erfasst wurden. Die Multikomponentendarstellung zeigt die Fluoreszenz für alle Zyklen in einem Lauf.

Negativkontrolle (NC) In StepOne™-System -Analysen die Aufgabe, die IPC-Zielsequenzen oder SNP-Assays in Wells zugewiesen ist, welche Wasser oder einen Puffer statt des Proben-Templates enthalten. In Wells mit Negativkontrolle sollte keine Amplifikation der Zielsequenz erfolgen.

Negativkontrolle mit blockierter IPC In Positiv/Negativ-Analysen Wells, die IPC-Inhibitoren statt des Proben-Templates in der PCR-Reaktion enthalten. In den durch die Negativkontrolle gehemmten IPC-Wells sollte keine Amplifikation erfolgen, da die Reaktion kein Proben-Template enthält und die Amplifikation der IPC unterdrückt wird. Wird auch No Amplification Control (NAC) genannt.

Nicht-fluoreszierender Quencher Minor Groove Binder (NFQ-MGB) Moleküle, die an das 3′-Ende der TaqMan®-Sonden gebunden sind. Bei intakten Sonden unterdrückt der nicht-fluoreszierende Quencher (NFQ) die Abgabe eines Fluoreszenzsignals durch den Reporterfarbstoff. Da der NFQ nicht fluoresziert, erzeugt er schwächere Hintergrundsignale, und dies führt zu größerer Präzision in der Quantifizierung. Der Minor Groove Binder (MGB) erhöht die Schmelztemperatur (Tm) ohne Zunahme der Sondenlänge. Er erlaubt auch die Realisierung kürzerer Sonden.

No Amplification Control (NAC) Siehe unter Negativkontrolle mit blockierter IPC.

No Template Control (NTC) Siehe Negativkontrolle (NC).

Normalisierte Menge Menge einer Zielsequenz dividiert durch die Menge der endogenen Kontrolle.

Normalisierter Reporter (R_n) Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs normalisiert auf das Fluoreszenzsignal der passiven Referenz.

Passive Referenz Farbstoff, der ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Da das Signal der passiven Referenz in allen Wells konsistent sein sollte, wird es verwendet, um das Reporterfarbstoff-Signal zu normalisieren, und Fluoreszenzschwankungen, die durch geringe Konzentrations- oder Volumenunterschiede zwischen den Wells entstanden sind. Das Normalisieren auf das Signal der passiven Referenz ermöglicht eine hohe Datengenauigkeit.

Phase Komponente des Thermoprofils. Eine Phase besteht aus einem oder mehreren Schritten.

Plattenbelegung Abbildung der 6 × 8-Gitterstruktur der Vertiefungen (Wells) und des ihnen zugewiesenen Inhalts in der Reaktionsplatte. In der Software können Sie die Plattenbelegung als Auswahlinstrument verwenden, um den Wells bestimmte Inhalte zuzuordnen und Well-Zuordnungen sowie um die Ergebnisse anzusehen. Die Plattenbelegung wird auf folgenden Bildschirmen angezeigt: Darstellungsassistent, Erweiterte Einrichtung, Lauf und Analyse. Die Plattenbelegung kann ausgedruckt, in einen Bericht übernommen, exportiert und als Folie für eine Präsentation gespeichert werden.

Positivkontrolle In Genotypisierungsanalysen die Aufgabe für den SNP-Assay in Wells, die ein Proben-Template mit einem bekannten Genotyp enthalten.

Post-PCR-Messung Teil des Gerätelaufs in Genotypisierungs- und Positiv/Negativ-Analysen, der nach der Amplifikation stattfindet. In Genotypisierungsanalysen werden die während der Post-PCR-Messung erfassten Fluoreszenzdaten im sog. Allelic Discrimination Plot (Alleldiskrimierungsdarstellung) dargestellt und zur Allelbestimmung verwendet. In Positiv/Negativ-Analysen werden die während der Post-PCR-Messung erfassten Fluoreszenzdaten im Positiv/Negativ-Plot dargestellt und zur Detektion verwendet. Wird auch als Endpunktmessung bezeichnet.

Prä-PCR-Messung Teil des Gerätelaufs in Genotypisierungs- und Positiv/Negativ-Analysen, der vor der Amplifikation stattfindet. Fluoreszenzdaten, die bei der Prä-PCR-Messung erfasst wurden, werden zur Normalisierung der Fluoreszenzdaten der Post-PCR-Messung verwendet.

Primer/Sonden-Mix PCR-Reaktionskomponente, die aus Primern zur Amplifikation der Zielsequenz und einer TaqMan®-Sonde zur Detektion der Amplifikation der Zielsequenz besteht.

Primer-Mix PCR-Reaktionskomponente, die den Forward Primer und Reverse Primer zur Amplifikation der Zielsequenz enthält.

Probe Das Template, das Sie untersuchen.

Probe oder Standard (10×) Reaktionskomponente, die unter dem Reiter Reaction Mix Calculations (Berechnung des Reaktionsmix) des Bildschirms Reaction Setup (Reaktionseinrichtung) angezeigt wird. Die Software nimmt an, dass die zum Reaktionsmix hinzugefügte Probe bzw. der Standard in einer 10fachen Konzentration vorliegt. Wenn das Reaktionsvolumen zum Beispiel 20 µl beträgt, beläuft sich das berechnete Proben- bzw. Standardvolumen für 1 Reaktion auf 2 µl.

Probe/SNP-Assay-Reaktion Kombination von Probe und SNP-Assay in einer PCR-Reaktion. Jede PCR-Reaktion kann nur eine Probe und einen SNP-Assay enthalten.

Probe/Zielsequenz-Reaktion Kombination von Probe und Zielsequenz in einer PCR-Reaktion. Im Analysedesign-Assistenten kann jede PCR-Reaktion nur eine Probe und eine Zielsequenz enthalten.

Probenbibliothek Sammlung von Proben in der StepOne™-Software. Die Probenbibliothek enthält die Probenbezeichnung und die Probenfarbe.

Proben-DNA (10×) Reaktionskomponente, die auf dem Reaktionseinrichtungsbildschirm angezeigt wird. Die Software nimmt an, dass die zum Reaktionsmix hinzugefügte Proben-DNA in einer 10fachen Konzentration vorliegt. Wenn das Reaktionsvolumen zum Beispiel 20 µl beträgt, beläuft sich das berechnete Probenvolumen für 1 Reaktion auf 2 µl.

Punkt Ein Standard in einer Standardkurve. Die Standardmenge für jeden Punkt in der Standardkurve wird auf der Grundlage der Ausgangsmenge und des Serienfaktors berechnet.

Quantifizierungs-methode Die in Quantifizierungsanalysen verwendete Methode zur Bestimmung der Zielsequenzmenge in den Proben. Für Quantifizierungsanalysen sind drei verschiedene Quantifizierungsmethoden verfügbar: Standardkurve, vergleichender C_T ($\Delta\Delta C_T$) und relative Standardkurve.

Quencher Molekül, das an das 3′-Ende der TaqMan®-Sonden gebunden ist, um zu verhindern, dass der Reporter ein Fluoreszenzsignal abgibt, solange die Sonde intakt ist. Bei TaqMan®-Reagenzien kann der nicht fluoreszierende Quencher Minor Groove Binder (NFQ-MGB) als Quencher verwendet werden. Bei SYBR Green-Reagenzien wird kein Quencher eingesetzt.

WICHTIG! Applied Biosystems empfiehlt nicht die Verwendung von TAMRA™ Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne™-System.

QuickStart Funktion in der StepOne™-Software, die es Ihnen erlaubt, die Analyse ohne die Eingabe von Platteneinrichtungsinformationen vorzunehmen.

R^2-Wert Regressionskoeffizient, berechnet aus der Regressionsgeraden in der Standardkurve. Der R^2-Wert gibt den Grad der Übereinstimmung zwischen der Regressionsgeraden der Standardkurve und den individuellen C_T-Datenpunkten der Standardreaktionen an. Ein Wert von 1,00 gibt eine perfekte Übereinstimmung zwischen der Regressionsgeraden und den Datenpunkten an.

Rampe Die Rate, mit der sich die Temperatur während des Gerätelaufs ändert. Mit Ausnahme des Schmelzkurven-Schritts wird die Rampe als Prozentsatz definiert. Beim Schmelzkurven-Schritt hingegen wird die Rampe als Temperaturanstieg definiert. In der grafischen Darstellung des Thermoprofils wird die Rampe durch eine diagonale Linie angezeigt.

Räumliche Kalibrierung Ein Kalibrierungstyp des StepOne™-Systems, bei dem das System die Positionen der Wells im Heizblock abbildet. Räumliche Kalibrierungsdaten dienen der Software zur Verknüpfung von Anstiegen der Fluoreszenz während eines Laufs mit spezifischen Wells auf der Reaktionsplatte.

Raw Data Plot (Rohdatenplot) Anzeige der Fluoreszenzamplitude für die ausgewählten Wells für alle Filter. Zeigt die Fluoreszenzamplitude von allen Datenerfassungspunkten in einem Lauf an.

Reagenzien

Die PCR-Reaktionskomponenten, die Sie zur Amplifikation der Zielsequenz und zur Detektion der Amplifikation verwenden. Arten von Reagenzien, die auf dem StepOne™-System verwendet werden:

- TaqMan®-Reagenzien
- SYBR® Green-Reagenzien
- Andere Reagenzien

Reaktionsmix

Lösung, die alle Komponenten für eine PCR-Reaktion enthält mit Ausnahme des Templates (Probe, Standard oder Kontrolle).

Real-time PCR

Prozess zur Erfassung von Fluoreszenzdaten während der PCR-Amplifikation. Real-time PCR-Daten werden zur Berechnung von Ergebnissen für Quantifizierungsanalysen oder zur Fehlerbehebung bei Genotypisierungs- oder Positiv/Negativ-Analysen verwendet.

Referenzprobe

In relativen Standardkurven- und vergleichenden C_T ($\Delta\Delta C_T$)-Analysen die Probe, die als Ausgangsbasis für relative Quantifizierungen verwendet wird. Wird auch als Kalibrator bezeichnet.

refSNP ID

Zahl, die die Referenz-SNP(refSNP)-Cluster-ID-Nummer bezeichnet. Wird durch die Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation (SNP-Datenbank der Variationen in Nukleotidsequenzen) generiert. Sie dient unter anderem dazu, in den Lagerbeständen von Applied Biosystems nach einem SNP-Genotypisierungs-Assay von Applied Biosystems zu suchen. Wird auch als rs-Nummer bezeichnet.

Regressionsgerade

In Standardkurven- und relativen Standardkurven-Analysen die Gerade bester Übereinstimmung aus der Standardkurve. Formel für die Regressionsgerade:

$C_T = m\ [\log (Qty)] + b$

wobei m die Steigung, b der y-Achsenabschnitt und Qty die Standardmenge ist.

Siehe auch unter Regressionskoeffizienten.

Regressions-koeffizienten

Aus der Regressionsgeraden in Standardkurven berechnete Werte, dazu gehört der R^2-Wert, die Steigung und der y-Achsenabschnitt. Sie können die Werte der Regressionskoeffizienten zur Bewertung der Qualität der Ergebnisse aus den Standards benutzen, siehe auch unter Standardkurve.

Reihe

Siehe unter Standardverdünnungsreihe.

Relative Standardkurven-Methode

Quantifizierungsmethode für Quantifizierungsanalysen. Bei der relativen Standardkurven-Methode werden Ergebnisse von Standards, einer Referenzprobe und einer endogenen Kontrolle zur Bestimmung der relativen Menge einer Zielsequenz in einer Probe verwendet.

Replikate

Gesamtzahl identischer Reaktionen mit identischen Komponenten und identischen Volumina.

Replikat-Gruppe

Ein Satz identischer Reaktionen in einer Analyse.

Reporter Fluoreszierender Farbstoff, der zur Detektion der Amplifikation verwendet wird. Wenn Sie TaqMan®-Reagenzien verwenden, ist der Reporterfarbstoff an das 5′-Ende gebunden. Wenn Sie SYBR® Green-Reagenzien verwenden, ist der Reporterfarbstoff SYBR® Green-Farbstoff.

Reporter Derivat ($-R_n'$) Angezeigt in der y-Achse der Schmelzkurve. Das Reporterderivat-Signal ist das negative erste Derivat der normalisierten Fluoreszenz des Reporters.

Reverse Primer Oligonukleotid, das an das 3′-Ende der Zielsequenz bindet. Der Reverse Primer und der Forward Primer werden zusammen in PCR-Reaktionen eingesetzt, um die Zielsequenz zu amplifizieren.

Reverse Transkriptase PCR-Reaktionskomponente, die RNA in cDNA umwandelt. Reverse Transkriptase wird zur PCR-Reaktion hinzugegeben, um eine 1-Schritt-RT-PCR durchzuführen.

R_n Abkürzung für normalisierter Reporter.

rs-Nummer Siehe unter refSNP ID.

Schmelzkurve Anzeige von Daten, die in der Schmelzkurvenphase erfasst wurden. Spitzenwerte in der Schmelzkurve können die Schmelztemperatur (Tm) der Zielsequenz angeben oder eine unspezifische PCR-Amplifikation identifizieren. Sie können die Schmelzkurve als normalisierten Reporter (R_n) im Vergleich zur Temperatur oder als Reporter-Derivat ($-R_n'$) im Vergleich zur Temperatur anzeigen lassen.

Schmelzkurvenphase Phase im Thermoprofil mit einem Temperaturanstieg zur Generierung einer Schmelzkurve.

Schmelztemperatur (Tm) Punkt in der Schmelzkurve, an dem die Fluoreszenzniveaus ein Höchstniveau erreichen und anzeigen, dass sich die doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA auftrennt.

Schritt Komponente des Thermoprofils. Ein Schritt wird durch die Temperatur, die Zeit, die Rampe und den Datenerfassungsstatus definiert. Für Zyklusphasen wird ein Schritt auch durch den AutoΔ Status definiert.

Schwellenwert Fluoreszenzniveau über der Grundlinie und innerhalb des exponentiellen Wachstumsbereichs des Amplification Plot (Amplifikationsdarstellung). Der Schwellenwert kann automatisch bestimmt werden (siehe automatischer C_T) oder er kann manuell festgelegt werden (siehe manueller C_T).

Schwellenwert-Zyklus (C_T) Der PCR-Zyklus, bei dem ΔR_n den Schwellenwert in der Darstellung der Amplifikation erreicht.

Serienfaktor Numerischer Wert, der die Sequenz von Mengen in der Standardkurve definiert. Der Serienfaktor und die Ausgangsmenge werden zur Berechnung der Standardmenge für jeden Punkt in der Standardkurve verwendet. Wenn die Standardkurve beispielsweise mit einem Serienfaktor von 1:10 oder 10 definiert ist, bedeutet das eine 10fache Differenz zwischen zwei beliebigen nebeneinander liegenden Punkten in der Kurve.

Setup für Fortgeschrittene Funktion in der StepOne™-Software, die es Ihnen erlaubt, die Analyse entsprechend Ihrem Analysedesign einzurichten.

SNP Abkürzung für Einzelnukleotid-Polymorphismus. Der SNP kann in einer Basendifferenz oder Indel (Insertion/Deletion) bestehen.

SNP-Assay In Genotypisierungsanalysen eine PCR-Reaktion, die Primer zur Amplifikation des SNP und zwei Sonden zur Detektion unterschiedlicher Allele enthält.

SNP-Assay-Bibliothek Sammlung von SNP-Assays in der StepOne™-Software.

Sonden-Mix PCR-Reaktionskomponente, die eine TaqMan®-Sonde zur Detektion der Amplifikation der Zielsequenz enthält.

Standard Probe, die bekannte Mengen eines Standards enthält. Standardreaktionen werden in Quantifizierungsanalysen verwendet, um Standardkurven zu generieren. Siehe auch unter Standardkurve und Standardverdünnungsreihe.

Standardkurve In Standardkurven- und relativen Standardkurven-Analysen:

[1] Die Kurve bester Übereinstimmung in einer Darstellung der C_T-Werte aus den Standardreaktionen, die gegen die Standardmengen aufgetragen werden, siehe auch unter Regressionsgerade.

[2] Ein Satz von Standards, der eine Reihe bekannter Mengen enthält. Daten der Standardkurven-Reaktionen werden zur Generierung der Standardkurve verwendet. Die Standardkurve ist durch die Anzahl der Punkte in der Reihe, die Anzahl der Standardreplikate, die Ausgangsmenge und den Verdünnungsfaktor definiert, siehe auch unter Standardverdünnungsreihe.

Standardkurven-Methode Quantifizierungsmethode für Quantifizierungsanalysen. Bei der Standardkurven-Methode werden Ergebnisse von Standards zur Bestimmung der absoluten Menge einer Zielsequenz in einer Probe verwendet.

Standardmenge Eine bekannte Menge in der PCR-Reaktion.

Bei Standardkurven-Analysen: die bekannte Menge der Zielsequenz. Die Maßeinheiten für Standardmengen können die Masse, Kopienzahl, Virusbelastung oder sonstige Größen für die Messung der Zielsequenzmenge betreffen.

Bei relativen Standardkurven-Analysen: eine bekannte Menge im Standard. Die Standardmenge kann sich zum Beispiel auf die Menge der cDNA oder die Menge der Stammlösung beziehen. Die Einheiten sind für relative Standardkurven-Analysen nicht relevant, da sie aus den Berechnungen herausfallen.

Standard-verdünnungsreihe In Standardkurven- und relativen Standardkurven-Analysen ein Satz von Standards, der eine Reihe bekannter Mengen enthält. Die Standardverdünnungsreihe wird durch serielle Verdünnung von Standards hergestellt. Der Standardstamm wird zur Herstellung der ersten Verdünnungsstufe verwendet, die erste Verdünnungsstufe wird wiederum zur Herstellung der zweiten verwendet usw. Die zur Herstellung einer Standardverdünnungsreihe notwendigen Volumina werden anhand der Anzahl der Verdünnungsstufen, der Anzahl der Standardreplikate, der Ausgangsmenge, des Verdünnungsfaktors und der Standardkonzentration in der Stammlösung definiert, siehe auch unter Standardkurve.

Steigung

Regressionskoeffizient, berechnet aus der Regressionsgeraden in der Standardkurve. Die Steigung gibt die Effizienz der PCR-Amplifikation für einen Assay an. Eine Steigung von −3,3 bedeutet eine 100%ige Amplifikationseffizienz, siehe auch unter Amplifikationseffizienz (EFF%).

SYBR® Green-Reagenzien

PCR-Reaktionskomponenten, die aus zwei Primern zur Amplifikation der Zielsequenz und SYBR® Green-Farbstoff zur Detektion doppelsträngiger DNA bestehen.

Systemfarbstoff

Von Applied Biosystems hergestellte und auf dem StepOne™-System vorkalibrierte Farbstoffe. Systemfarbstoffe:

- FAM™-Farbstoff
- JOE™ Farbstoff
- ROX™ Farbstoff
- SYBR® Green Farbstoff
- VIC® Farbstoff

TaqMan® Reagenzien

PCR-Reaktionskomponenten, die aus Primern zur Amplifikation der Zielsequenz und einer TaqMan®-Sonde zur Detektion der Amplifikation der Zielsequenz bestehen.

Temperature Plot (Temperaturgraph)

Anzeige der Temperaturen für Probe, Heizdeckel und Heizblock während des Gerätelaufs.

Template

Nukleinsäuretyp, der zur PCR-Reaktion hinzugefügt wird. Das zu empfehlende Template hängt jeweils vom Analysentyp ab.

Thermoprofil

Teil der Lauftyps, der Temperatur, Zeit, Rampe und Datenerfassungspunkte für alle Schritte und Phasen des Gerätelaufs angibt.

Tm

Abkürzung für Schmelztemperatur (Tm).

Touchscreen

Geräteanzeige, mit der Sie durch Berührung das Gerät steuern.

Unbekannt

In Quantifizierungsanalysen die Aufgabe für die Zielsequenz in Wells, die ein Proben-Template mit unbekannter Zielsequenzmenge enthalten.

In Genotypisierungsanalysen die Aufgabe für den SNP-Assay in Wells, die ein Proben-Template mit unbekanntem Genotyp enthalten.

In Positiv/Negativ-Analysen die Aufgabe für die Zielsequenz in Wells, die ein Proben-Template enthalten, in dem ein Vorhandensein der Zielsequenz nicht bekannt ist.

Verdünnungsfaktor

Siehe unter Serienfaktor.

Verdünnungsmittel

Reagenz, das zur Verdünnung einer Probe oder eines Standards verwendet wird, bevor diese zur PCR-Reaktion hinzugegeben werden. Als Verdünnungsmittel kann Wasser oder ein Puffer verwendet werden.

Vergleichende C_T ($\Delta\Delta C_T$)-Methode

Quantifizierungsmethode für Quantifizierungsanalysen. Bei der vergleichenden C_T ($\Delta\Delta C_T$)-Methode werden Ergebnisse von einer Referenzprobe und einer endogenen Kontrolle zur Bestimmung der relativen Menge einer Zielsequenz in einer Probe verwendet.

Well herauslassen Maßnahme, die Sie nach der Analyse durchführen, um einen oder mehrere Wells aus der Gesamtanalyse auszuschließen, bevor Sie die Daten erneut analysieren.

Well verwerfen Maßnahme, die während der Analyse von der Software durchgeführt wird, um einen oder mehrere Wells aus der weiteren Analyse auszuschließen, wenn einem Well eine bestimmte Markierung zugewiesen wird.

y-Achsenabschnitt Regressionskoeffizient, berechnet aus der Regressionsgeraden in der Standardkurve. Der y-Achsenabschnitt gibt den erwarteten Schwellenwert-Zyklus (C_T) für eine Probe mit einer Menge gleich 1 an (z. B. 1 ng/µl).

Zielsequenz Die Nukleinsäuresequenz, die Sie amplifizieren und bestimmen möchten.

Zielsequenzbibliothek Sammlung von Zielsequenzen in der StepOne™-Software.

Zielsequenzfarbe Einer Zielsequenz zugeordnete Farbe, um diese in den Plattenbelegungs- und Analyse-Darstellungen zu identifizieren.

Zyklusphase Phase im Thermoprofil, die wiederholt wird. Wenn die Zyklusphase zur Durchführung einer PCR verwendet wird, nennt man sie Amplifikationsphase.

Zyklus-Schwellenwert Siehe unter Schwellenwert-Zyklus (C_T).

Stichwortverzeichnis

Nummerische Einträge

5′-Nuklease-Assay 5

A

Abfallentsorgung, Richtlinien xvii
Abfallprodukte, Beschreibung xvii
Abteilung für Informationsentwicklung, kontaktieren viii
AIF, siehe unter *Assay-Informationsdatei*.
Allel 119
Allelbestimmung
  automatisch 98
  manuell 99
Allelic Discrimination Plot (Alleldiskriminierungsplot) 6, 119
  Bestimmungen manuell zuweisen 99
  Ergebnisse beurteilen 74–77
Allgemeine xix
Amplification Plot (Amplifikationsdarstellung) 119
  Ansehen nach dem Lauf 90–95
  Während eines Laufs überwachen 58
Amplifikation 119
  Ansehen nach dem Lauf 90–93
  Kurve 92
  Markierung NOAMP 82
  Während eines Laufs überwachen 58
Amplifikationseffizienz (EFF%) 119
Amplikon 119
Analyse 120
Analyse anlegen
  Beispielanalyse 15
  Drucken 28
  übertragen Siehe *Daten übertragen*.
Analyse ausführen
  Arbeitsablauf 46
  Benachrichtigungseinstellungen aktivieren 49–51
  Daten übertragen 66
  Starten 51
  Überwachen 55
  Vorbereiten auf 47
Analyse auswerten, siehe auch *Fehlerbehebung*.
  Multikomponentendarstellung ansehen 88
  Plattenbelegung ansehen 78
  Raw Data Plot (Rohdatendarstellung) ansehen 86
  Well-Tabelle ansehen 80
Analyse vorbereiten
  Arbeitsablauf 36
  Hinweise 37, 39, 42
  Probenverdünnungen 37
  Reaktionsmix 38
  Reaktionsplatte 40
  Weitere Informationen 36
Analysedesign einrichten
  Arbeitsablauf 14
  Beenden des Analysedesign-Assistenten 32
  Bestellen von Materialien 29
  Definieren der Analyseeigenschaften 16
  Einrichten der SNP-Assays 20
  Einrichten des Lauftyps 25
  Hinweise 17, 19, 22, 24, 26, 29, 31, 33
  neu anlegen 15
  Reaktionen einrichten 27
Analysedesign-Assistent 120
  Bildschirm Experiment Properties (Analyseeigenschaften) 16
  Bildschirm Materials List (Materialliste) 29
  Bildschirm Reaction Setup (Reaktionseinrichtung) 27
  Bildschirm Run Method (Lauftyp) 25
  Bildschirm SNP-Assays 20
  fertigstellen 32
Analysename 120
Analysetyp 120
Anwenderbeachtungsbegriffe, beschrieben vi
Applied Biosystems
  Abteilung für Informationsentwicklung viii
  kontaktieren ix
  Kunden-Feedback über Dokumentation viii
  Technischer Support ix
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, siehe *StepOne™-System*
Arbeitsablauf
  Analysedesign-Assistent 11
  Erweiterte Einrichtung 102
  Export/Import 113
  QuickStart 107
  Template 112
Arbeitsablauf der erweiterten Einrichtung 9, 102, 129
Arbeitsablauf des Analysedesign-Assistenten 11
Arbeitsablauf für den Export/Import 113
Assay 120
Assay ID 120
Assay-Informationsdatei (AIF) 20, 120
Assay-Mix 38, 120

Aufgabe 121
Auftragsbezogene Assays 121
Ausgangsmenge 121
Ausreißer 121
Auswählen von Wells 79
Auswerten der Analyse, siehe auch *Fehlerbehebung*
  Arbeitsablauf 72
  Auswerten 72
  Hinweise 76, 79, 82, 85, 87, 89, 92, 97
  Well-Tabelle ansehen 80
Auswertungsbildschirme
  Allelic Discrimination Plot (Alleldiskriminierungsplot) 74–77
  Amplification Plot (Amplifikationsdarstellung) 90–93
  Bildschirm QC Summary (Zusammenfassung der Qualitätskontrolle) 84–85
  Multicomponent Plot 88–89
  Multiple Plots View (Ansicht mit mehreren Plots) 94
  Plattenbelegung 78–80
  Raw Data Plot (Rohdatendarstellung) 86–87
  Well-Tabelle 80–83
Auswertungseinstellungen 95–97
Auswertungshinweise 76, 79, 82, 85, 87, 89, 92, 97
AutoΔ 121
automatische Allelbestimmung 98
Automatische Grundlinie 121
Automatischer C_T 121

B

Beispielanalyse
  Arbeitsablauf 11
  Auswerten 72
  Beschreibung 9
  Daten 73, 74, 78, 80, 84, 86, 88, 90, 95
  Design 14, 18, 20, 23, 25, 27, 49
  Lauf 46
  Plattenbelegung 10
  Reaktionen ansetzen 36
  Speicherort der Daten 10
Benachrichtigungseinstellungen 49–51
Benötigte Materialien 29, 37, 38, 40
Bewegen und anheben, Sicherheit xiii
Bildschirm Experiment Properties (Analyseeigenschaften) 16
Bildschirm Materials List (Materialliste) 29
Bildschirm Reaction Setup (Reaktionseinrichtung) 27
Bildschirm Run Method (Lauftyp) 25
Bildschirm SNP-Assays 20
biogefährlicher Abfall, Handhabung xvii

C

Chemie, siehe unter *Reagenzien*
Chemische Sicherheit xiv
chemische Sicherheit xiv
CLUSTER Marikierung 82
C_T, siehe unter *Schwellenwert-Zyklus*

D

Daten übertragen 52, 67
Datenerfassung 122
Delta Rn (ΔRn) 122
Dissoziationskurve, siehe unter *Schmelzkurve*
Dokumentation, dazugehörig vii

E

Echtzeit-PCR 127
EFF%, siehe unter *Amplifikationseffizienz (EFF%)*
eigenständige
  Datenübertragung 68
  Konfiguration 122
  Lauf starten 52
  Überwachung eines Laufs 65
Einzelnukleotid-Polymorphismus 4
Elektrische Sicherheit xviii
EMV-Normen xx
Endogene Kontrolle 122
Endogene Kontrolle,
  siehe auch unter *Haushaltsgen*.
Endpunktanalyse 2, 4, 122
Endpunktmessung, siehe unter *Post-PCR-Messung*
Ergebnisse
  Bestimmungen automatisch zuweisen 98
  Bestimmungen manuell zuweisen 99
Ergebnisse interpretieren 72
Erweiterte Einrichtung 129

F

Farbstoff 122
Farbstoff,
  siehe auch unter *Systemfarbstoff*
Farbstoffe von Fremdanbietern 122
Fehlerbehebung
  Amplifikationsdarstellung ansehen 90
  Ansehen der Auswertungseinstellungen 95
  Grundlinienwert anpassen 95
  Markierungen 82
  Multikomponentendarstellung ansehen 88
  Raw Data Plot (Rohdatendarstellung) ansehen 86
  Schwellenwert anpassen 95
  Zusammenfassung der Qualitätskontrolle ansehen 84
Ferngesteuerte
  Datenübertragung 67

Fernüberwachung 122
Fett gedruckter Text, wann zu verwenden v
Fluoreszenz
  Markierung 82
  Markierung NOISE 82
  Markierung OFFSCALE 82
  Markierung SPIKE 82
Forward Primer 122

G

GEFAHR, Beschreibung x
Gefährdung *Siehe* Sicherheit
Gefahrensymbole
  Siehe Sicherheitssymbole
Gefahrensymbole, *siehe* Sicherheitssymbole, auf Geräten
Gehemmte IPC 121
Gehemmte IPC,
  siehe auch unter *IPC-Wells, durch Negativkontrolle gehemmt*.
Gerätebetrieb, Sicherheit xiv
Grundlinie
  Automatische 121
  Informationen 92, 123
Grundlinienkorrigierter normalisierter Reporter (ΔRn) 123

H

Haltephase 123
Haushaltsgen, siehe unter *Endogene Kontrolle*
Heiz-/Kühlgeschwindigkeit 19, 126
Hilfesystem, zugreifen viii
Hinweise
  Auswertung 76, 79, 82, 85, 87, 89, 92, 97
  Design 17, 19, 22, 24, 26, 29, 31, 33
  Lauf 50
  sicherer Umgang mit Chemikalienabfällen xvii
  Vorbereitung 37, 39, 42

I

Installationskategorie xviii
Interne Positivkontrolle (IPC) 123
Inventarisierte Assays 123
IPC 123
IPC+ 123
IPC-Inhibitor 123
IPC-Wells mit Negativkontrolle 123
IPC-Wells mit Negativkontrolle,
  siehe auch unter *IPC+*.
IPC-Wells, durch Negativkontrolle gehemmt 124

K

Kalibrator, siehe unter *Referenzprobe*
kombinierte
  Datenübertragung 67
  Konfiguration 121
  Lauf starten 51
  Überwachung eines Laufs 56
Kontrolle
  negativ 23, 24, 76, 78, 89
  positiv 23, 24, 76
Konventionen
  Anwenderbeachtungsbegriffe vi
  fett gedruckter Text v
  Hinweise vi
  in diesem Handbuch v
  kursiv gedruckter Text v
  Sicherheit x
  WICHTIG! vi
  zur Beschreibung von Menübefehlen v
Konzentration der verdünnten Probe (10✕ für Reaktionsmix) 123
Kunden-Feedback, über Unterlagen von Applied Biosystems viii
Kursiv gedruckter Text, wann zu verwenden v
Kurven, siehe *Amplifikationskurve*

L

Lauf starten
  eigenständige 52
  kombinierte 51
Lauf überwachen
  Amplification Plot (Amplifikationsdarstellung) 58
  eigenständige 65
  Fernüberwachung 62
  Kombinierte Konfiguration 56
  Lauftypanzeige 60
  Temperaturgraph 59
Lauf vorbereiten 36
Laufhinweise 50
Lauftyp 123
  Einrichten 25
  Überwachen 60

M

manuelle Allelbestimmung 99
Manuelle Grundlinie 124
Manueller C_T 124
Markierung
  AMPNC 82
  BADROX 82
  BLFAIL 82
  CLUSTER 82
  CTFAIL 82
  EXPFAIL 82
  NOAMP 82
  NOISE 82
  NOSIGNAL 82
  OFFSCALE 82

PCFAIL 82
SMCLUSTER 82
SPIKE 82
THOLDFAIL 82
Markierung AMPNC 82
Markierung BADROX 82, 84
Markierung BLFAIL 82
Markierung CTFAIL 82
Markierung EXPFAIL 82
Markierung NOAMP 82
Markierung NOISE 82
Markierung NOSIGNAL 82
Markierung OFFSCALE 82
Markierung PCFAIL 82
Markierung SMCLUSTER 82
Markierung SPIKE 82
Markierung THOLDFAIL 82
Markierungen 82
Mehrere Darstellungen ansehen 94
Menge 124
Menübefehle, Konventionen zur Beschreibung v
Multicomponent Plot 88, 124

N

Negativkontrolle 78, 89, 124
anwenden 23, 24
bestätigen 76, 80
Markierung AMPNC 82
Nicht-fluoreszierender Quencher Minor Groove Binder (NFQ-MGB) 124
No Amplification Control (NAC), siehe unter *IPC-Wells, durch Negativkontrolle gehemmt*.
NO SIGNAL Markierung 82
No Template Control (NTC), siehe *Negativkontrolle (NC)*.
Normalisierte Menge 124
Normalisierter Reporter (Rn) 124
Normen
EMV xx
Sicherheit xx
Normen zur elektromagnetischen Verträglichkeit. *Siehe*EMV-Normen
NOSIGNAL 82

O

Online-Hilfe. *Siehe* Hilfesystem

P

Passive Referenz 125
Markierung BADROX 82
Phase 125
Plattenbelegung 78, 125
Plus/Minus-Assay
Ergebnisbestimmungen 94
Positivkontrolle 125
anwenden 23, 24
bestätigen 76, 80, 82
Markierung PCFAIL 82
Post-PCR-Messung 125
Prä-PCR-Messung 125
Primer/Sonden-Mix 125
Primer-Mix 125
Probe 125
Probe oder Standard (105) 125
Probe/SNP-Assay-Reaktion 125
Probe/Zielsequenz-Reaktion 126
Probenbibliothek 126
Proben-DNA (10×) 126
Punkt 126

Q

Quantifizierungsmethode 126
Quencher 126
QuickStart-Arbeitsablauf 107, 126

R

R2-Wert 126
Radioaktiver Abfall, Handhabung xvii
Rampe 126
Räumliche Kalibrierung 126
Raw Data Plot (Rohdatendarstellung) 86, 127
Reagenzien 127
Bestellen 29
TaqMan®-Reagenzien 4–6
Reaktionsmix 127
Ansetzen 38
Bestellen 29
Einrichten 27
Reaktionsplatte
Ansetzen 40
Bestellen 29
Einlegen 48
entnehmen 66
kompatibel
Reaktionsplatte einlegen 40
Reaktionsplatte entnehmen 66
Referenzprobe 127
refSNP ID 127
Regressionsgerade 127
Regressionsgerade, siehe auch unter *Regressionskoeffizienten*
Regressionskoeffizienten 127
Regressionskoeffizienten, siehe auch unter *Standardkurve*
Reihe, siehe unter *Standardverdünnungsreihe*

Relative Standardkurven-Methode 127
Replikate 127
Replikat-Gruppe 128
Reporter 128
Reporter-Derivat (- Rn′) 128
Reverse Primer 128
Reverse Transkriptase 128
Richtlinien
  chemische Sicherheit xiv
Rn, siehe unter *Normalisierter Reporter* 128
rs-Nummer, siehe unter *refSNP ID*

S

Schmelzkurve 128
Schmelzkurvenphase 128
Schmelztemperatur (Tm) 128
Schritt 128
Schulung, Informationen über ix
Schwellenwert 128
Schwellenwert, anpassen 95
Schwellenwert-Zyklus (C_T) 128
Serienfaktor 128
Sicherer Umgang mit Chemikalienabfällen xvi, xvii
Sicherheit
  Arbeitsplatz xix
  Bewegen/Anheben xiii
  biologische Gefahren xix
  Chemikalienabfälle xvi
  chemische xiv
  elektrische xviii
  Gerät bewegen und anheben xiii
  Gerätebetrieb xiv
  Hinweise xvii
  Konventionen x
  Normen xx
  Richtlinien xiv, xvii
  vor Betrieb des Geräts xiii
  Vorschriften xvi
Sicherheit am Arbeitsplatz xix
Sicherheitsdatenblätter (MSDSs)
  Beschreibung xv
Sicherheitsdatenblätter, abrufen ix
Sicherheitsdatenblätter, erhalten xv
Sicherheitshinweise, auf Geräten xii
Sicherheitsnormen xx
Sicherheitssymbole, auf Geräten xi
SNP 129
SNP-Assay 4, 129
Sonden-Mix 129
Standard 129
Standard,
  siehe auch unter *Standardkurve* und *Standardverdünnungsreihe*
Standardkurve 129
Standardkurve,
  siehe auch unter *Regressionsgerade* und *Standardverdünnungsreihe*
Standardkurven-Methode 129
Standardmenge 129
Standardverdünnungsreihe 129
Standardverdünnungsreihe,
  siehe auch unter *Standardkurve*
Steigung 130
Steigung,
  siehe auch unter *Amplifikationseffizienz (EFF%)*
StepOne™-System
  Datenerfassung 2
  Informationen 2
  Konfigurationen 121, 122
  Reagenzien 4
  Verbrauchsmaterialien
SYBR® Green-Reagenzien 130
Symbole, Sicherheit xi
Systemfarbstoff 130

T

TaqMan® MGB-Sonden 5
TaqMan® SNP-Genotypisierungs-Assays 4
TaqMan®-Reagenzien 130
Technischer Support, kontaktieren ix
Temperaturgraph 59, 130
Template 130
Template, vorbereiten 37
Textkonventionen v
Thermoprofil 130
Tm, siehe auch unter *Schmelztemperatur* 130
Touchscreen 130

U

Überspannungskategorie (Nennwert) xviii
Unbekannte Proben 130
unbekannte Proben 23, 78
unspezifische Fluoreszenz 6

V

Verbrauchsmaterialien 3, 29, 37, 38, 40
  Siehe auch *Benötigte Materialien*
Verdünner 130
Verdünnungsfaktor, siehe unter *Serienfaktor*
Vergleichende C_T ($\Delta\Delta C_T$)-Methode 130

Verwenden von Vorlagen 112
Verwendung des Handbuchs
als Tutorial 8
Voraussetzungen für die Verwendung dieses Handbuchs v
Vorbereitungshinweise 37, 39, 42
Vorschriften
Entsorgung von Chemikalienabfällen xvi
VORSICHT, Beschreibung x

W

WARNUNG, Beschreibung x
Well auslassen 131
Well verwerfen 131
Wells
auswählen 79
Negativkontrolle 78
Plattenbelegung 78
Positivkontrolle 78
unbekannt 78
Well-Tabelle 80
Wells ausnehmen 81, 83
Well-Tabelle 80
WICHTIG, Beschreibung x

Y

y-Achsenabschnitt 131

Z

Zielsequenz 131
Zielsequenzbibliothek 131
Zielsequenzfarbe 131
Zyklusphase 131
Zyklus-Schwellenwert, siehe unter *Schwellenwert-Zyklus*

Worldwide Sales and Support

Applied Biosystems vast distribution and service network, composed of highly trained support and applications personnel, reaches 150 countries on six continents. For sales office locations and technical support, please call our local office or refer to our Web site at **www.appliedbiosystems.com**.

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists

Headquarters
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404 USA
Phone: +1 650.638.5800
Toll Free (In North America): +1 800.345.5224
Fax: +1 650.638.5884

06/2010

Applied Biosystems

Bestell-Nr. 4377728 Version B